



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Epidemiologia molecular dels brots de gastroenteritis per norovirus i d'hepatitis A: de la seqüència consens a la quasiespècie

Aurora Sabrià Sunyé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
Facultat de Biologia

Epidemiologia molecular de brots de gastroenteritis per norovirus i d'hepatitis A: de la seqüència consens a la quasiespècie

Memòria presentada per Aurora Sabrià Sunyé par a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora i tutora

Directora

Dra. Susana Guix Arnau

Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Doctoranda

Aurora Sabrià Sunyé
Barcelona, 2018

AGRAÏMENTS

Arriben els agraïments i això vol dir que ja s'acaba aquesta etapa. Si miro enrere, com vaig començar i ara, veig que he fet un gran canvi. Un inici ple d'inseguretats i dubtes, que he anat superant al llarg d'aquests anys. Una de les coses més importants que m'emporto d'aquesta etapa és creure més amb mi mateixa i, només per això, ha valgut la pena.

Durant aquests anys m'ha acompanyat molta gent, que d'una manera o altre, amb el seu granet de sorra, m'ha fet costat.

En primer lloc vull agrair a la Susana, per donar-me un vot de confiança i l'oportunitat de fer una tesi doctoral. Per la seva proximitat i per tot el que m'ha ensenyat i guiat en aquest camí. A la Rosa i l'Albert, per donar-me l'oportunitat de formar part del grup i donar-me suport en els moments durs de la vida. A l'*sprint* final amb la Rosa, perquè després de tot esforç, arriba la recompensa.

Vull donar les gràcies a tots els companys de laboratori amb els qui he compartit part o tot aquest camí; a la Mari, Lucia, Nerea, Noemí, al Fran que sempre m'ha ajudat quan li he demanat, sobretot amb els dubtes de càlculs. A la Cris, de les persones més eficaç i intel·ligent i que val tant. A l'Albert junior, per ajudar-me sempre que ho he necessitat (ànims! Que el pròxim ets tu!). Als estudiants que han anat passant al llarg dels anys, uns més discrets que altres, com la Maria, la Marta i el Ferran; i als que estan a punt d'acabar com la Marta, la Cèlia i l'Arnau (l'estudiant més ben documentat! El que m'ha fet perdre més ràpidament la paciència però que ahora m'ha fet riure tant, amb qui hem xerrat de política i dels norovirus a hores on ja no quedava ningú al departament).

A la Ceci, la meva “madre” yankee-argentina. Gràcies pel temps que vam compartir juntes, pels sopars de “vino y queso”, per ensenyar-me els menjars *gourmet* i per ser única. A la Diem, la última incorporació doctoranda del grup i a qui tant admiro (una superwoman). Pel seu aire fresc, pel seu entusiasme a aprendre i millorar les coses, pel seu suport, generositat i ganes d’ajudar. Per preguntar-me sempre per les seqüències i si ja sortien d’una vegada. Per les nostres coordinacions amb els horaris de la cabina de PCR i els termocicladors. Per ser un sol de persona.

I, sobretot, a la Montse i a l’Anna. No hauria estat igual sense vosaltres. Gràcies per acompanyar-me i ajudar-me a creure en mi mateixa. Amb vosaltres he viscut el dia a dia. Amb molts moments compartits des d’aprenentatge, frustracions, riures, plors, consells, cafès, ànims, empipaments, xarrades, vins, menjars, festes, sortides... i que espero que seguim fent. Gràcies Anna per la teva disposició per ajudar, per donar-me sempre ànims i fer-me costat. Per fer les coses més fàcils i tenir el lab organitzat. Per la teva visió de fer “material de seguretat” que ens ha tret d’un mal pas més d’un cop. Pels nostres cants de “mi gran noche” i de “lolololololo” a qualsevol hora, que sempre ens acompanyaran! Se’t troba a faltar al lab, però estic més que contenta de que siguis feliç. Gràcies Montse per ser la meva companya en aquesta etapa, amb qui he viscut tota l’experiència i amb qui dia a dia hem anat fent camí. Des de l’inici de tot, amb l’escriptura del pla de recerca, fins a la paperassa del dipòsit. Per les xarrades i els consells, per ajudar-me quan ho he necessitat, per escoltar-me i animar-me. Per estar al meu costat en aquesta vivència.

A tota la secretaria: la Bea, la Rosario, la Susana, la Mònica i el Manolo, per tota l’ajuda amb tots els temes pesats administratius i pels bailoteos dels sopars de nadal!

A la Gala, el Manu, l'Ale, el Pedro i la Geno (la meva veci), per fer els dinars més divertits amb un toc dolç de *chocobooms* al final. Per ser tots uns sols de persones (encara que Manu... últimament només em vens a veure pel carregador del mòbil o per espantar-me...), pel vostre aire fresc, pels riures que hem fet, i que estic més que segura que tot us anirà genial.

Al temps compartit amb la Marga i al David. A la Sara i la Laura, per fer-me companyia aquest últim temps de tesi mentre estava al pc del seu costat, pels seus ànims i per tenir sempre un somriure.

Al Xavi, la Martus, la Sandra, la Laurus, la Carmins, l'Alberto, el David, l'Eva, la Tecles i l'Edu (la nova incorporació al grup de virus entèrics, que em fa molta il·lusió tenir-te al costat i poder treballar junts). Gràcies a tots i a cada un per ser únics i fer-se estimar. Per fer aquests anys més especials i que mai oblidaré. Per la vostra companyia, suport i ànims. Des del inici de les meves primeres pràctiques amb la Laurus, els dinars del "dia del pollo", les diades a ple sol amb el "mojito" de la Carmina, els sopars de tesis, les caminades cap a casa amb el Xavi, la posada en comú de les teories d'algunes series (de vegades amb *spoilers...*), els bailoteos dels sopars de Nadal, les sortides a cases rurals, les xarrades de tot tipus, els sopars d'aniversaris, les vivències vàries als congressos (al de Madrid o com la cagada de gavina com a *#hechos* al de Cádiz, que passarà a la història!), l'ajuda amb la maquetació de la tesi (gràcies Sandra!!)... en definitiva, gràcies per tots els moments compartits.

A l'Alex, la Eli, el Pablo, la Julia, la Raquel, l'Aiora, la Laura Sala, l'Ayalke, l'Elena, la Maryuri, la Yexe, la Miriam... a cada un que, d'alguna manera o altre, m'ha acompanyat aquests anys.

Al Damir, per ensenyar-me amb paciència la preparació de la llibreria de MiSeq. Per tots els intents de que sortís d'una vegada la lligació que al final, després d'un any provant ho vam aconseguir!

Vull donar les gràcies també a tots els amics de fora del departament. Per l'estimació i per tots els moments que hem viscut junts, pels ànims i el seu suport. Que amb alguns, malgrat veure'ns poc, és com si el temps no passés.

A la família del Yol, per preguntar-me sempre com ho portava i els ànims que m'han donat.

Gràcies a tota la meva família, però en especial als meus pares i germans, per tot l'amor que m'han transmès i per fer-me sempre costat. Pel seu suport incondicional i la preocupació de que sigui feliç. Gràcies per creure sempre en mi, pel vostre recolzament, pels valors que meu donat i per ser com sou. No puc deixar d'esmentar els avis, l'avi Jaume i l'avi Ton, a qui trobo a faltar i que estic segura que estarien molt orgullosos.

I per últim al Yol, gràcies per estar sempre al meu costat, animar-me i creure en mi. Per el teu carinyo i els teus mimos. Per la tranquil·litat i calma que em dones, traient importància a les coses i fer-les més fàcils i senzilles. Per aquest últim temps, la paciència i ànims que sempre m'has donat. En definitiva, gràcies per fer-me sentir molt estimada.

Gràcies a tots per fer-me sentir afortunada.

ÍNDEX

LLISTA D'ABREVIATURES I GLOSSARI	ix
INTRODUCCIÓ	1
1. ELS VIRUS ENTÈRICS	3
1.1. ELS CALICIVIRUS HUMANS	6
1.1.1. Els norovirus humans	8
1.1.2. Organització genòmica	9
1.1.3. Classificació i nomenclatura	11
1.1.4. Diversitat genètica i evolució	15
1.1.5. Cicle biològic i cicle cel·lular	17
1.1.6. Estructura del virió	22
1.1.7. Epítops descrits de la VP1.....	23
1.1.8. Susceptibilitat de l'hoste	25
1.1.9. Epidemiologia de les infeccions per HuNoV.....	27
1.1.9.1. Vies de transmissió.....	27
1.2.9.1.1. <i>Brots transmesos per aliments</i>	29
1.2.9.1.2. <i>Brots transmesos persona a persona</i>	30
1.2.9.1.3. <i>Brots transmesos per aigües</i>	31
1.1.9.2. Incidència i vigilància epidemiològica	31
1.1.9.3. Importància clínica i diagnòstic	33
1.1.9.4. Control de la infecció i tractament.....	35
1.2. L'HEPATITIS A	36
1.2.1. El virus de l'hepatitis A	37
1.2.2. Organització genòmica	38
1.2.3. Classificació.....	40
1.2.4. Evolució de l'HAV.....	41
1.2.5. Cicle biològic i cicle cel·lular	43
1.2.6. Estructura del virió	47

1.2.7.	Epidemiologia de les infeccions per HAV	49
1.2.7.1.	Vies de transmissió.....	49
1.2.7.2.	Incidència i vigilància epidemiològica	51
1.2.7.3.	Importància sanitària i diagnòstic	55
1.2.7.4.	Control de la infecció i tractament.....	57
2.	NOUS MÈTODES MOLECULARS	61
2.1.	Seqüenciació de segona generació.....	62
2.1.1.	454/GS-Junior (Roche)	63
2.1.2.	Illumina Sequencing	64
2.2.	Seqüenciació de tercera generació.....	67
	OBJECTIUS	71
	INFORME DELS ARTICLES.....	75
1.	Informe dels articles publicats i dels seus factors d'impacte	77
2.	Informe de coautoria dels articles publicats	79
	PUBLICACIONS	81
	Article I	83
	Article II	97
	Article III	109
	Article IV	141
	DISCUSSIÓ.....	175
	CONCLUSIONS.....	203
	BIBLIOGRAFIA	207

LLISTA D'ABREVIATURES I GLOSSARI

5'NCR	Regió no codificant 5' (<i>5' non coding region</i>)
3'NCR	Regió no codificant 3' (<i>3' non coding region</i>)
°C	Graus centígrads
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartat aminotransferasa
cDNA	DNA complementari
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EEA	Espai Econòmic Europeu (<i>European Economic Area</i>)
eHAV	Partícules d'HAV pseudoembolcallades
eIF4E	Factor d'iniciació eucariota 4E
eIF3	Factor d'iniciació eucariota 3
emPCR	PCR en emulsió
FHs	Manipuladors d'aliments (<i>food handler</i>)
FUT	Fucosil transferasa
FVC	Calicivirus felí
GI	Genogrup I
GII	Genogrup II
GEA	Gastroenteritis aguda
HAV	Virus de l'hepatitis A
HBGA	Antígens del grup histosanguini (<i>histo-blood group antigens</i>)
HCWs	Treballadors d'institucions sanitàries (<i>healthcare worker</i>)
HIV	Virus de la immunodeficiència humana
HuNoV	Norovirus humans
ICTV	Comitè internacional de taxonomia de virus (<i>International committee on taxonomy of viruses</i>)
IgA	Immunoglobulina A

IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma (<i>Internal ribosomal entry site</i>)
IRIVs	Virosomes d'influenza reconstituïts (<i>Immuno reconstitued influenza virosomes</i>)
Kb	Kilobase
Le	Lewis
MID	Identificador (<i>Multiplex IDentifier</i>)
MNoV	Norovirus murí
mRNA	RNA missatger
MSM	Homes que tenen sexe amb altres homes (<i>men-having-sex-with-men</i>)
NGS	Seqüenciació de nova generació (<i>Next-generation sequencing</i>)
Nm	Nanòmetres
NoV	Norovirus
OMS	Organització Mundial de la Salut
ORF	Pauta oberta de lectura (<i>Open reading frame</i>)
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
qPCR	PCR quantitativa
RdRp	RNA polimerasa RNA dependent
RNA	Àcid ribonucleic
RT	Retrotranscripció
SaV	Sapovirus
SBS	Seqüenciació per síntesi (<i>Sequencing by synthesis</i>)
SMRT	Seqüenciació a temps real de cadena única (<i>Single molecule real time sequencing</i>)

SNP	Polimorfisme de nucleòtid únic (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
VLP	Partícula pseudovírica (<i>Virus-Like particle</i>)
VP	Proteïna vírica, normalment estructural (<i>Viral protein</i>)
VPg	Proteïna viral unida al genoma (<i>Viral protein genome-linked</i>)
ZMW	Guia d'ona de "mode zero" (<i>Zero-mode waveguide</i>)

Reads: conjunt de seqüències resultants del procés de seqüenciació

Haplotip: conjunt de genomes amb la mateixa seqüència de nucleòtids

INTRODUCCIÓ

1. ELS VIRUS ENTÈRICS

El terme de virus entèrics fa referència a qualsevol virus de transmissió fecal-oral, ja sigui per consum d'aigua o aliments contaminats o per contacte persona a persona, que infecta principalment el tracte gastrointestinal [1]. S'han anat descobrint al llarg del temps, la llista és nombrosa, i inclou virus que pertanyen a diferents famílies. Entre ells destaquen els rotavirus, norovirus (NoV), sapovirus (SaV), astrovirus, enterovirus, adenovirus entèrics i els virus de l'hepatitis A (HAV) i E (HEV), que pertanyen a diferents famílies i difereixen en la seva estructura, àcid nucleic i morfologia. Tots són força resistents podent superar les condicions àcides de l'estómac de camí a l'intestí on, majoritàriament, infecten cèl·lules epitelials. Les malalties associades són gastroenteritis i hepàtiques [1].

Les malalties diarriques en humans han estat reconegudes des de l'antiguitat. Malgrat els avenços en el coneixement de la bacteriologia, parasitologia i virologia durant el segle passat, l'etiologia de la majoria dels casos de malaltia diarreica seguia sent desconeguda. A principis dels anys 70 es va saber que els virus causaven la majoria d'aquestes infeccions degut a que es recuperaven bacteris només d'una petita proporció d'episodis de gastroenteritis i que s'aconseguí reproduir un quadre clínic de diarrea en voluntaris usant filtrats de femtes procedents de brots lliures de bacteris [2].

Avui dia, les malalties diarriques són una de les principals causes de morbiditat i mortalitat en tot el món i tenen un impacte immens en la salut pública global. Amb les millores del sanejament de l'aigua han disminuït les morts per diarrees a totes les edats a nivell global [3] i la vacunació per rotavirus, implantada a més de 70 països, també ha contribuït significativament a aquesta disminució [4]. No obstant, la malaltia diarreica continua sent la quarta causa més freqüent

de mortalitat i la segona causa més freqüent de morbiditat a tot el món en infants menors de 5 anys [3].

Les hepatitis A i E també tenen un gran impacte en la salut pública mundial. L'hepatitis A continua sent la causa més freqüent d'hepatitis aguda a tot el món, però la seva incidència varia amb la ubicació geogràfica, essent altament endèmica a les regions en desenvolupament i molt menys freqüent en regions desenvolupades [5]. La infecció és majoritàriament asimptomàtica en infants menors de cinc anys, i la gravetat va augmentant amb l'edat, sent més greu en els majors de seixanta anys. Degut a que la infecció indueix immunitat per a tota la vida, les infeccions greus en adults en regions endèmiques són rares, ja que els infants s'han infectat durant els primers anys de vida. Per contra, en els països no endèmics, on els infants no han estat immunitzats, la malaltia es produeix majoritàriament a l'edat adulta, essent els símptomes molt més severes. Aquesta infecció es transmet principalment pel consum d'aigua o aliments contaminats, per pràctiques sexuals de risc i per contacte persona a persona [6]. En el cas de l'HAV existeix una vacuna efectiva des del 1990. A Catalunya, al setembre del 1998, s'inicià un programa de vacunació a tots els preadolescents de la vacuna combinada de l'hepatitis A+B. No obstant, no s'administra de forma rutinària a totes les comunitats autònomes d'Espanya ni tampoc a gaires països, fet que provoca l'aparició de brots d'hepatitis A.

De tots els agents virals, el NoV humà (HuNoV) i l'HAV són dos dels virus entèrics més rellevants (Taula 1.1.), essent responsables de la majoria de brots de naturalesa vírica transmesos pels aliments [7][8]. Poden contaminar una àmplia varietat de productes alimentaris, ja sigui durant la producció primària, com ara maduixes regades amb aigües contaminades o marisc cultivat en aigües amb matèria fecal, o a través d'una manca d'higiene del personal a l'hora de manipular aliments.

Taula 1.1. Principals característiques de HuNoV i HAV.

	HuNoV	HAV
Patologia associada	Gastroenteritis aguda	Hepatitis aguda
Període d'incubació	12-60 h	~ 1 mes
Excreció pre-símptomes	Sí, durant poques hores abans	Sí, durant dues setmanes abans
Excreció post-símptomes	Sí, durant aproximadament 3 setmanes	Sí, el títol va disminuint al llarg del temps
Nivell màxim d'excreció en fentes	10 ¹⁰ còpies genòmiques/g (període simptomàtic)	10 ⁸ -10 ¹¹ còpies genòmiques/g (període pre-simptomàtic)
Infecció simptomàtica en nens	Sí	Poc freqüent
Dosi infecciosa 50	18-2800 còpies genòmiques (individus secretors)	50-100 còpies genòmiques
Durada immunitat	6-12 mesos	Tota la vida
Variabilitat genètica	Molt elevada (> 40 genotips)	Serotip únic
Incidència anual mundial	~ 684 milions	~1.5 – 14 milions
Distribució geogràfica	Mundial i homogènia	Zones endèmiques i distribució geogràfica de genotips
Percentatge de casos d'origen alimentari	~20%	<5% (infravalorat)
Vacuna	En fase d'assaigs clínics, possible aplicació en grups de risc	Disponible; obligatòria a Catalunya, Ceuta i Melilla, en grups de risc en la resta de CCAA espanyoles

Els virus entèrics doncs tenen un impacte elevat en la salut pública global i en el camp de la microbiologia d'aliments i ambiental. Els grans avenços en el

diagnòstic han millorat la nostra comprensió de l'etiologia de les gastroenteritis i les hepatitis, el paper de cada agent patogen, les diferents formes de transmissió i els principals mètodes de control que han de ser considerats.

1.1. ELS CALICIVIRUS HUMANS

La família *Caliciviridae* està composta per virus petits, sense envolta, de simetria icosaèdrica amb una mida d'uns 27-40 nm de diàmetre. Tenen un genoma RNA de cadena simple i polaritat positiva. La família es divideix en cinc gèneres, que inclou els *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus (NoV)*, *Sapovirus (SaV)*, i els *Nebovirus* [9]. Aquest últim gènere va ser el darrer inclòs dins la família i inclou calicivirus entèrics bovins associats a diarrees en vedells joves [10].

Els virus del gènere *Vesivirus*, *Lagovirus* i *Nebovirus* són importants patògens d'animals com ara felins, lagomorfs i bovins, respectivament. Dins de cada gènere de la família *Caliciviridae* es poden definir diferents espècies basades en la relació genètica (Taula 1.1.1) [11].

Taula 1.1.1. Gèneres i espècies classificats dins de la família *Caliciviridae*.

FAMÍLIA	GÉNERE	ESPECIE TIPUS
<i>Caliciviridae</i>	<i>Vesivirus (VeV)</i>	Virus de l'exantema vesicular porcí (VESV) Calicivirus Felí (FCV)
	<i>Lagovirus (LaV)</i>	Virus de la malaltia hemorràgica del conill (RHDV) Virus de la síndrome de la llebre parda europea (EBHSV)
	<i>Nebovirus</i>	Newbury-1 virus
	<i>Norovirus (NoV)</i>	Norwalk virus
	<i>Sapovirus (SaV)</i>	Sapporo virus

Els NoV i SaV constitueixen el grup de calicivirus humans i són importants agents causals de gastroenteritis aguda (GEA). La malaltia causada pels calicivirus humans va ser descrita inicialment l'any 1929 per Zahorsky com a "malaltia del vòmit d'hivern" (*winter vomiting disease*) degut a la seva preferència estacional i al predomini d'episodis de vòmits com a símptoma primari [12]. Entre el 1945 i el 1953 les GEA no bacterianes foren repetidament demostrades, però a pesar dels esforços realitzats no s'aconseguia cultivar ni caracteritzar *in vitro* l'agent etiològic.

L'any 1972, Kapikian *et al.* [13] van identificar per primer cop el que es coneixeria posteriorment com a virus Norwalk, durant un brot de gastroenteritis en un centre escolar a Norwalk, Ohio, al 1968. Es van estudiar les femtes de voluntaris als quals se'ls havia administrat un filtrat de femtes, lliures de bacteris, procedents de les mostres recollides dels pacients afectats en el brot mitjançant microscòpia immunoelèctrica [14]. Observaren agregats de petites partícules de simetria cúbica i d'uns 27 nm de diàmetre menor i de 32 nm de diàmetre major, aproximadament [13]. Posteriorment, fruit d'aquestes investigacions, s'identificaren altres virus mitjançant microscòpia elèctrica amb una morfologia semblant però antigènica diferents, que es van denominar d'acord amb les regions geogràfiques d'on s'havien produït els casos, com ara el virus de Hawaii o el Snow Mountain entre d'altres.

Tradicionalment es van anomenar com a *Norwalk-like viruses* (NLVs) o *Small round structured viruses* (SRSVs), fins que el *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV) va aprovar el terme de Norovirus (NoV) com a nom genèric l'any 2002.

L'altre calicivirus humà es va identificar a partir d'un brot en un orfenat a Sapporo, Japó, l'any 1977 [15]. S'anomenà com a virus Sapporo convertint-se

en la soca prototip per al grup de virus *Sapporo-like viruses* (SLVs), coneguts avui com a Sapovirus (SaV) [16]. Des d'aleshores, han estat detectats predominantment en casos esporàdics de GEA a la població infantil [17].

Des del seu descobriment, els mecanismes de patogènesi dels HuNoV no es coneixen gaire, degut a la manca d'un sistema de cultiu cel·lular o d'un model animal per a propagar-los durant molts anys.

1.1.1. Els norovirus humans

Des del seu descobriment, els HuNoV s'han convertit en un dels principals protagonistes en el camp de les gastroenteritis. Afecten a tots els grups d'edat i, avui en dia, es consideren els agents causants de 684 milions d'episodis de diarrea i 212,000 morts cada any a nivell global [3]. Tenint en compte el total d'infeccions diarreïques que tenen un origen alimentari, s'estima que els HuNoV en causen aproximadament el 20% [8].

Hi ha varies fites importants que han permès avançar profundament en el coneixement dels HuNoV. L'any 1990 es va comprendre la virologia molecular d'aquest virus gràcies a la clonació del genoma del virus Norwalk [18]. Una altra fita important a la història dels NoV fou al 1992 quan Jiang *et al.* [19] van produir les primeres partícules pseudovíriques (*virus-like particles*, VLP) usant un sistema d'expressió de baculovirus recombinants en cèl·lules d'insecte Sf9, un sistema que ha estat àmpliament utilitzat. Aquestes VLPs són morfològica i antigènica similars als NoV nadius.

Una altra va ser al 2014 on Jones *et al.* [20] van desenvolupar un sistema de cultiu cel·lular *in vitro* en cèl·lules B humanes (cèl·lules BJAB) que suportaren la infecció amb la soca GII.4 Sydney. La fita més recent a destacar en la història dels HuNoV es va produir l'any 2016, quan la Dra. Mary K. Estes i el seu equip a Baylor College of Medicine van cultivar exitosament múltiples soques de

HuNoV en enteroids intestinals d'origen humà [21]. Els cultius d'enteroids derivats de cèl·lules mare del duodè, jejú i ili foren susceptibles a la infecció per HuNoV i a diferència de les cèl·lules BJAB, les epitelials exhibiren efecte citopàtic [22].

1.1.2. Organització genòmica

El genoma dels HuNoV, com tota la resta de membres de la família *Caliciviridae*, està constituït per una molècula d'RNA de cadena senzilla, polaritat positiva de mida d'entre 7.5 a 7.7 kb [23]. Està organitzat en tres pautes obertes de lectura (*open reading frames*, ORFs) tot i que altres gèneres de la família només en tenen dos. Tenen l'extrem 5' de l'RNA unit covalentment a la proteïna VPg i l'extrem 3' poliadenilat (Fig. 1.1.2.1). Les regions no codificants (NCR) de cada extrem del genoma són típicament curtes i contenen estructures secundàries d'RNA evolutivament conservades, que s'estenen en les regions codificants i que es poden trobar a tot el genoma. Aquestes estructures són importants per la replicació, traducció i patogènesi viral [24].

Els tres ORFs codifiquen per un total de vuit proteïnes (Fig. 1.1.2.1). El primer ORF, l'ORF1, és el més llarg i codifica per una poliproteïna precursora (de 1.789 aminoàcids en Norwalk) que s'escindeix en sis proteïnes que es processen co- i post- traduccionalment per la proteasa vírica, per a originar les proteïnes no estructurals madures, imprescindibles per la replicació del virus. L'ordre codificant de l'extrem N a C terminal són: p48, NTPase, p22, VPg, proteasa (3CL^{pro}), i polimerasa (la RNA polimerasa RNA dependent, RdRp).

L'ORF2 i l'ORF3 són traduïts a partir de l'RNA subgenòmic (Fig. 1.1.2.1) i codifiquen, respectivament, per a la proteïna major de la càpsida, la VP1 i per a la proteïna menor de la càpsida, la VP2 [25]. L'RNA subgenòmic és idèntic als últims 2.4 kb del genoma, també s'uneix covalentment a VPg a l'extrem 5' i conté una cua poli(A) a l'extrem 3'. L'RNA subgenòmic és una estratègia per a

produir nivells més elevats de proteïna de la càpsida per l'ensamblatge del virus, ja que està present en nivells més elevats en cèl·lules infectades que no pas l'RNA genòmic [24][25].

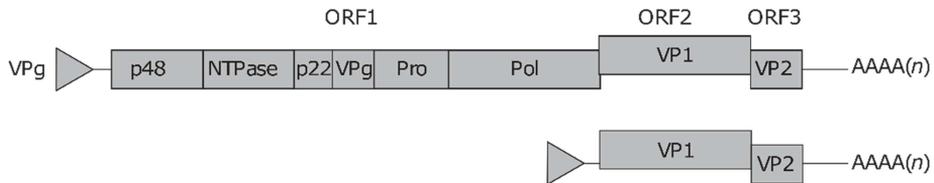


Figura 1.1.2.1. Organització genòmica dels HuNoV. Durant la replicació es sintetitza un RNA subgenòmic que actua com a motlle per a la traducció de les proteïnes estructurals, que també està covalentment unit a la proteïna VPg en l'extrem 5', i poliadenilat en l'extrem 3'. Imatge adaptada de [24].

La càpsida de HuNoV està formada per 180 còpies de la proteïna VP1, concretament per 90 dímers de VP1 (veure apartat 1.1.6). A nivell molecular, aquesta proteïna majoritària VP1 està formada per uns 530-555 aminoàcids, amb un pes molecular de 58-60 kDa. Està organitzada en diferents dominis: un domini més conservat, el "shell" (S), i un domini protuberant (P) més variable (Fig. 1.1.2.2. A). El domini S està constituït per 225 aminoàcids i forma la part interna de la càpsida. Aquest domini rodeja el genoma i conté elements essencials per la formació de l'icosaedre. El domini P forma les protuberàncies de l'estructura arquejada que sorgeixen de la coberta i que conté els dímers de contacte. Està compost de dos subdominis: el P1 que va del residu 226 al 278 i del 406 al 520. Mentre que P1 és més conservat, el subdomini P2 és la regió més exposada a la superfície, caracteritzant-se per ser la regió més variable de la càpsida i conté els llocs d'unió al receptor (Fig. 1.1.2.2. B) [25][26].

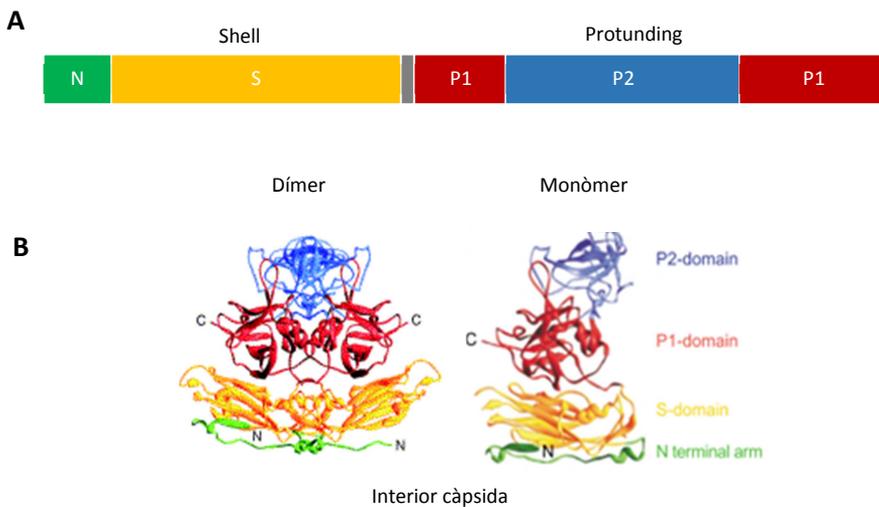


Figura 1.1.2.2. A: Regions de la proteïna de la càpsida VP1. Es divideix en la regió N-terminal (verd) formant l'interior, el domini S (groc) que constitueix la superfície del virus i el domini protuberant P que emana de la superfície del domini S. Aquest es subdivideix en els subdominis P1 (vermell) i P2 (blau). **B:** Estructura de VLP de Norwalk obtinguda mitjançant cristal·lografia de raig X de 3.4 Å. Esquerra el dímer i a la dreta el monòmer de la proteïna VP1. La llegenda de colors és igual a **A**, quedant el subdomini P2 a la superfície més distal de les VLP. Imatge adaptada de [27].

1.1.3. Classificació i nomenclatura

La classificació del gènere *Norovirus* està basada en la diversitat en aminoàcids de la proteïna VP1 completa. Es classifiquen en 7 genogrups (G), dels quals el GI, el GII i el GIV infecten als humans. Els dos primers són els responsables de la majoria de casos, mentre que el GIV no és tant freqüent. El GIII infecta espècies bovines, el GV a espècies murines i el GVI i GVII a espècies canines [28]. Al seu temps, en base a la seqüència total d'aminoàcids de VP1, cada genogrup està subdividits en genotips i aquest en subgrups, amb el prototip del virus Norwalk designat com a GI.1 (genogrup I, genotip 1). De forma paral·lela, i degut a que es coneix que la recombinació juga un paper important en l'evolució dels NoV, els virus dins de cada genogrup també es subclassifiquen en base a la diversitat genètica de la seqüència de la RdRp, donant lloc a un sistema de classificació dual en base a les dues regions. Així, per exemple, la nomenclatura actual

contempla que en el nom d'una soca s'inclogui tant el genotip en base a la polimerasa (genotip "P") com el de la càpsida. D'aquesta manera, el virus Norwalk s'anomenaria GI.P1-GI.1.

En el cas dels HuNoV, en base a la regió de la càpsida, a data d'avui s'han descrit 9 genotips dins del GI, 19 dins del GII i 2 dins el GIV, tots ells en constant evolució. De tots aquests genotips, el GII.4 ha estat el més prevalent durant les dues darreres dècades, i dins d'aquest genotip, també s'han descrit diferents soques o variants que han anat emergent de forma periòdica cada 2-3 anys, desplaçant les soques predominants anteriors en l'espai i el temps. Aquestes variants GII.4 s'han anat anomenant en base al nom del lloc geogràfic i el moment en el que han estat aïllades per primera vegada (ex: GII.4_New Orleans2009, GII.4_Sydney2012...). Tres genotips de GII: el GII.11, GII.18, i GII.19 s'han detectat únicament en porcs i el GIV.2 únicament en felins i canins (Fig. 1.1.3.1).

Per a la regió de la polimerasa s'han descrit 14 genotips dins de GI (GI.P) i 27 dins de GII (GII.P) [28].

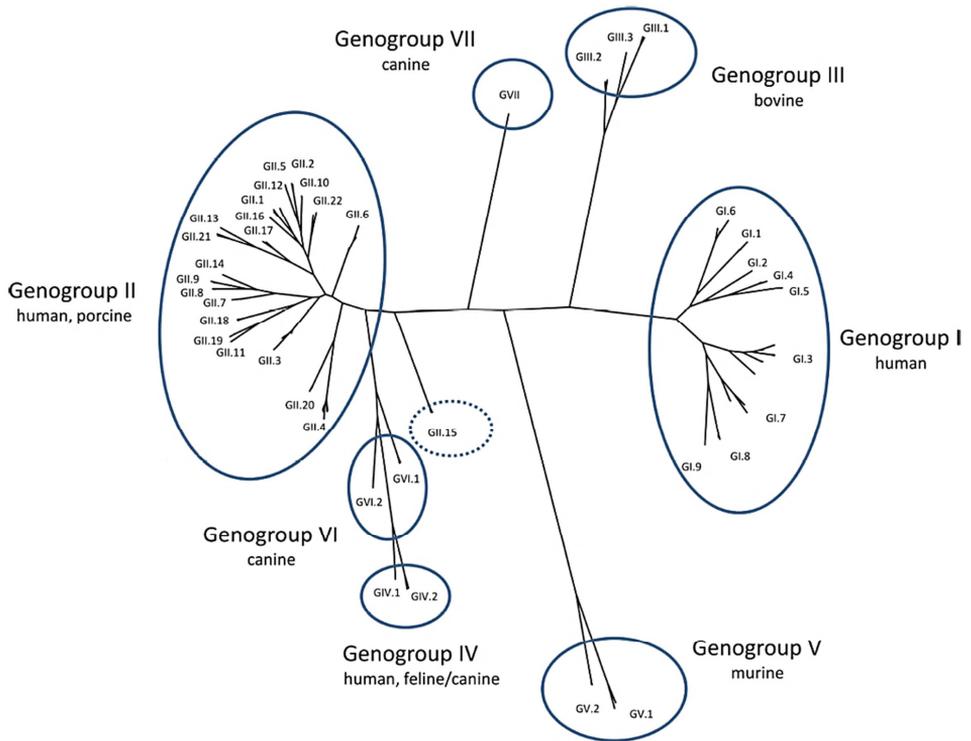


Figura 1.1.3.1. Classificació dels NoV en els 7 genogrups i els diferents genotips basats en la diversitat de la seqüència de la proteïna de la càpsida VP1 completa. Imatge extreta de [28].

Amb el temps, s'han anat identificant soques de NoV que contenen una seqüència de polimerasa nova combinada amb un genotip de l'ORF2 ja establert, i això fa que el nombre de genotips "P" sigui major que el de genotips de la càpsida. En un moment donat, Bull *et al.* [29] van proposar un sistema de nomenclatura (de l'a a la d) per a polimerases orfes.

La manca d'una pauta per a la nomenclatura de NoV durant força temps, va donar lloc a nomenclatures diferents per al mateix genotip i força confusió en la literatura científica. La necessitat d'establir una nomenclatura estandaritzada fou reconeguda a la 4a Conferència Internacional de Calicivirus que va tenir lloc a Xile el 2010, on es va designar un grup de treball per a consensuar un sistema

de terminologia. Així doncs, al 2013 Kroneman *et al.* [30] publicaren la proposta de nomenclatura acceptada actualment. A més, van trobar noves seqüències ORF1 orfes, que s'identificaren amb les lletres GII.e i GII.g, i es van identificar també genotips nous de VP1, anomenats GII.21 i GII.22 per als antics grups orfes, GII.b i GII.d proposats per Bull *et al.*

Resumidament, i com s'ha esmentat anteriorment, en la terminologia actual la soca rep dos noms, el del genotip "P" que és de la polimerasa (de l'ORF1) i el genotip de la càpsida (de l'ORF2). D'aquesta manera, aquest enfoc de tipatge dual incloses les formes recombinants permet el seguiment dels NoV [31]. Per exemple, la variant GII.4_Sydney2012 es va associar principalment amb GII.Pe, però l'any 2015 van sorgir les soques recombinants GII.P16-GII.4_Sydney2012 causant el 61.5% dels brots, i també s'han descrit soques recombinants GII.P4, que és el genotip ORF1 més freqüentment associat a GII.4_New Orleans2009, amb GII.4_Sydney2012 [32].

En tot, el nom de la soca s'hauria d'escriure de la següent manera:

NoV/	norovirus GI, norovirus GII, etc.
hoste/	Hu (humà), Bo (boví), Mu (murí), Po (porcí), Ca (caní), Ra (rata), Ov (oví)
codi país (ISO)/	FR, DE, US, JP, etc.
any mostreig/	2004
genogroup i genotip (ORF1 i ORF2)/	GII.P4_GII.4, GII.4 si només es coneix la seqüència de l'ORF2
nom de la variant	ciutat, i si és necessari seguit d'un número identificador de soca

Un exemple seria:

NoV GII/Hu/GB/2010/GII.P4_GII.4_NewOrleans2009/London48.

Les actualitzacions es van publicant a la pàgina web de NoroNet:

<http://www.noronet.nl/>

Finalment, degut a que de forma rutinària no s'obté la seqüència completa del gen VP1 o de la RdRp, el tipatge de les soques es fa generalment en base a seqüències parcials d'aquests gens. Existeixen diferents regions que s'han utilitzat de forma més estesa amb aquesta finalitat, com serien la regió A o la B dins el gen que codifica per a la RdRp, o les regions C, D o E dins el gen VP1 (Fig. 1.1.3.1). D'aquestes, la regió C és en general més sòlida que la D, ja que aquesta última està localitzada a una part més variable de l'ORF2. A la pàgina web de NoroNet, existeix una eina online àmpliament utilitzada per a fer el tipatge de NoV tant a nivell de la RdRp com de la càpsida [33].

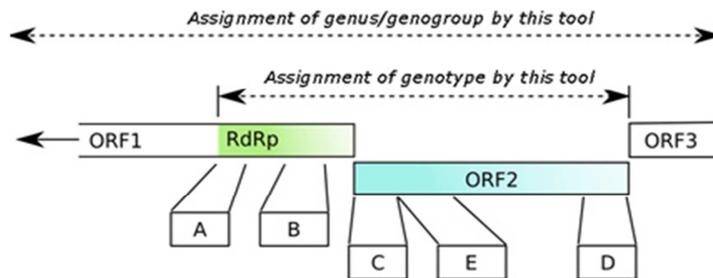


Figura 1.1.3.1. Diferents regions emprades per al tipatge de NoV. Imatge extreta de <http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>.

1.1.4. Diversitat genètica i evolució

Els virus RNA evolucionen ràpidament, amb taxes de mutació que varien d'entre 10^{-4} - 10^{-6} mutacions per parell de base per generació, mentre que els virus de doble cadena de DNA tenen taxes de mutació de 10^{-6} - 10^{-8} . Això es deu a que les seves polimerases no tenen activitat correctora per corregir errors durant la replicació [34].

La RdRp de NoV té una alta taxa d'error i s'ha vist que la RdRp de GII.4 té una taxa major que altres genotips [35]. Aquest ampli grau de variabilitat genètica, juntament amb processos de recombinació entre soques co-circulants, fa que

els HuNoV vagin evolucionant a noves soques. Això, sense dubte, és un factor que complica la immunitat a llarg termini i contribueix a que un individu pugui patir infeccions repetides al llarg de la vida.

Malgrat que s'ha identificat un alt nombre de genotips de HuNoV, el GII.4 és el que està associat amb major freqüència a epidèmies de gastroenteritis a tot el món. En les últimes dècades, els patrons epidemiològics dels GII.4 han reflectit un patró similar al del virus influenza A [36], amb canvis constants de l'especificitat de l'hoste per a l'acumulació de mutacions puntuals i recombinació genòmica sota la pressió de la immunitat d'aquest. Això fa que noves variants antigèniques sorgeixin cada dos-tres anys reemplaçant a l'anterior [37]. En comparació amb altres soques, la fidelitat de la polimerasa de GII.4 és menor i, per tant, al fer més mutacions proporciona un benefici en l'aptitud. Permet que el virus canvi ràpidament i així evitar el reconeixement immunològic a l'alterar les seves propietats antigèniques [37]. La pressió immunològica doncs influeix en la seva evolució [26]. Des del 1995, sis variants antigèniques de GII.4 han resultat en pandèmies: US 95_96, Farmington Hills 2002, Hunter 2004, Den Haag 2006b, New Orleans 2009 i Sydney 2012 [38]. La major taxa de mutació i evolució en aquest genotip en comparació amb la resta probablement facilita l'aparició de noves soques antigènicament divergents [35]. Al novembre del 2015 es van detectar a EEUU HuNoV GII.4 amb diferències nucleotídiques a la regió C, comparades amb la soca circulant en aquell moment, la Sydney 2012. Mitjançant la seqüenciació de nova generació (*Next-generation sequencing*, NGS) es va veure que aquesta nova soca era una recombinant de la càpsida de GII.4 Sydney amb la polimerasa GII.P16 (GII.P16_GII.4 Sydney), essent la causa predominant dels brots notificats de l'hivern del 2015 i tot el 2016 [31][32].

S'ha produït un augment important de brots degut a una nova soca, la GII.P17_GII.17, que sorgí en algunes part d'Àsia reemplaçant la GII.4 Sydney 2012 [39][40][41]. A Europa i EEUU també s'han detectat casos de GEA per aquesta soca però sense reemplaçar el genotip predominant GII.4.

A més, des de mitjans del 2016 també s'ha observat un augment d'un altre genotip recombinant, el GII.P16_GII.2, a diferents parts de l'Àsia com ara Japó [42] i Xina [43]. A l'hivern del 2016-2017 es va veure un augment de casos deguts a aquest genotip a Alemanya [44] i a França [45]. Segons dades de la xarxa de vigilància de brots de HuNoV dels EEUU, CaliciNet, des del setembre del 2017 fins febrer del 2018, el 12% dels brots notificats van ser causats per aquesta soca recombinant, suggerint la seva distribució mundial.

És important doncs la comprensió dels mecanismes que afavoreixen l'aparició d'aquestes noves variants, així com també el reservori on es generen. Amb l'aplicació de les tècniques de NGS s'ha vist que la diversitat viral d'un individu immunosuprimit i la d'un individu sa és molt diferent: en una infecció aguda típica la població viral es manté relativament homogènia i estable mentre que en els individus amb un sistema immunitari deficient, presenta una alta diversitat viral. Aquest fet suggereix que els individus immunosuprimits i crònicament infectats, són un reservori potencial per a la l'aparició de noves variants [46][47].

1.1.5. Cicle biològic i cicle cel·lular

Els HuNoV inicien la infecció de l'hoste amb l'entrada del virus per la seva ingestió. Els virions són estables en ambients àcids fet que els hi permet sobreviure al recorregut a través de l'estómac i arribar al teixit diana principal, l'intestí. Allà hi tindria lloc la replicació vírica a gran escala i, finalment, els virus produïts abandonarien el tracte gastrointestinal de l'hoste mitjançant les femtes.

El cicle replicatiu dels calicivirus és ràpid, es pot detectar una nova progènie viral en poques hores després de la infecció.

La incapacitat de cultivar els HuNoV en cultiu cel·lular o sobre algun model animal ha dificultat molt l'estudi i caracterització del seu cicle biològic. Al llarg dels darrers anys, molts aspectes relacionats tant amb el tropisme com el cicle replicatiu a nivell cel·lular, s'ha extrapolat a partir de l'estudi de virus de la mateixa família utilitzats com a model.

Un dels primers models utilitzats va ser el calicivirus felí (FVC). El FVC, membre del gènere *Vesivirus* va ser el primer calicivirus pel qual es disposava d'un sistema de cultiu cel·lular i s'ha usat àmpliament per a l'estudi de diversos aspectes del cicle cel·lular dels calicivirus. No obstant, el FVC representa un model inapropiat pels HuNoV degut a que la malaltia que causa és respiratòria a diferència de la gastrointestinal dels HuNoV. Malgrat les diferències en la patogènesi, degut al bon creixement *in vitro* i que pot ser fàcilment manipulat genèticament, es va convertir en un model atractiu per a l'estudi del mecanisme molecular de la traducció i replicació del genoma [48].

L'any 2003 es va identificar per primera vegada el norovirus murí (MNoV) i va passar a utilitzar-se també com a model, tant per estudis de replicació cel·lular com del cicle biològic. El MNoV pertany al genogrup V dins del mateix gènere *Norovirus*, causa infecció letal en ratolins immunosuprimits i és un virus de transmissió fecal-oral. El MNoV és l'únic NoV que pot propagar-se de manera eficient *in vitro*, amb un tropisme per a les cèl·lules dendrítiques i els macròfags [49] i, a més, també pot utilitzar-se per a infectar ratolins, proporcionant així un model animal rentable i genèticament ben caracteritzat. No obstant, cal remarcar que com qualsevol model, els MNoV també presenten limitacions. Apart de possibles diferències en el tropisme cel·lular, els MNoV poden causar amb facilitat infeccions persistents, mentre que els HuNoV es caracteritzen per

una ràpida infecció aguda i la posterior eliminació. A més la variabilitat genètica dels MNoV és menor a la dels HuNoV [48].

En els darrers 40 anys s'han fet nombroses proves de cultivar els HuNoV en diferents tipus cel·lulars, incloent macròfags derivats de la sang i cèl·lules dendrítiques, la majoria d'elles sense èxit [50][51][52][53][54]. Només recentment, s'han publicat estudis significativament rellevants en aquest aspecte. Jones *et al.* al 2014 [20][55] van desenvolupar un sistema de cultiu cel·lular en les línies cel·lulars BJAB i Raji (cèl·lules B de limfoma de Burkitt) que va revelar que l'actual soca GII.4 Sydney podia infectar cèl·lules B humanes. Aquesta infecció a més es veia afavorida per HBGA lliure o per bacteris que expressaven HBGA, suggerint que els bacteris comensals podien servir com a cofactor per a la infecció. Estudis amb MNoV també van indicar que les cèl·lules B intestinals eren cèl·lules diana *in vivo* i que la infecció requeria bacteris entèrics [20]. Aquest sistema però només ha aconseguit la propagació d'una única soca, de HuNoV i també va plantejar dubtes sobre la seva rellevància *in vivo*, degut a que està documentat que els HuNoV poden infectar a pacients amb deficiència de cèl·lules B [56].

Posteriorment, l'any 2016, Ettayebi *et al.*[21] van cultivar exitosament múltiples soques de HuNoV en enteroids intestinals d'origen humà. Van usar el mètode desenvolupat per l'equip del Dr. Hans Clevers [57][58][59], basat en un nou sistema de propagació i diferenciació de cultius humans multicel·lulars, anomenats enteroids (*human intestinal enteroids*, HIEs), els quals s'originen a partir de cèl·lules mare aïllades de les criptes intestinals de teixit intestinal humà. En aquest estudi revolucionari també es va observar que la bilis és un factor crític del medi intestinal necessari per a la replicació de HuNoV, i va permetre confirmar que els HuNoV podien infectar enteroids derivats de biòpsies de diferents parts de l'intestí prim, destacant així l'enteròcit com a diana cel·lular de la infecció i replicació dels HuNoV.

Tot i que aquest tropisme dual cap a limfòcits B [20] i enteròcits [21] observat *in vitro* pels HuNoV és difícil de confirmar de forma clara *in vivo*. Els estudis recents fets amb MNoV semblen corroborar que presenten una dualitat semblant [60]. Des de poc després del seu descobriment, es coneix que MNoV infecta cèl·lules del sistema immunitari tant *in vivo* com *in vitro* i, recentment, també s'ha identificat una subpoblació de cèl·lules epitelials intestinals, les cèl·lules *tuft*, que poden ser infectades pel virus amb un paper especialment rellevant en les infeccions persistents [61][62]. Les cèl·lules *tuft* són cèl·lules epitelials intestinals que expressen alguns gens propis de cèl·lules del sistema immunitari; en condicions normals són molt poc abundants, però augmenten el seu nombre sota determinats estímuls.

A nivell cel·lular, se sap que la interacció dels NoV amb la superfície cel·lular involucra estructures de carbohidrats, que en el cas dels HuNoV inclouen els antígens del grup histosanguini (HBGA). En el cas dels MNoV s'ha vist que s'uneix a les cèl·lules a través de l'àcid siàlic, glicolípid i glicoproteïnes, i també s'han identificat proteïnes de la família CD300 com a receptors essencials per a la infecció [63][64]. El mecanisme pel qual els HuNoV entren dins la cèl·lula encara no es coneix del tot, però se sap que en el cas del MNoV és dependent de dinamina i colesterol [65][66]. Un cop dins la cèl·lula té lloc la desencapsidació (Fig. 1.1.5.1). Com són virus d'RNA de polaritat positiva, aquest es comporta com a un RNA missatger (mRNA) essent transcrit i traduït en el citoplasma. La traducció és assistida per factors traduccionals de l'hoste que són reclutats per la proteïna VPg del virus, que s'uneix covalentment a l'extrem 5' del genoma. La VPg de HuNoV i MNoV interactuen amb els components del complex del factor de iniciació de la traducció eIF4E i eIF3 [24].

La poliproteïna codificada per l'ORF1 és escindida per la proteasa codificada pel virus (Pro) a sis proteïnes individuals: la p48, la NTPasa, la p22, la VPg, la Pro i la RdRp. Durant la replicació del genoma, l'(+)-RNA és transcrit a RNA de polaritat

negativa el qual s'usa com a motlle per a la síntesi de nous RNAs genòmics i subgenòmics (+)RNA. L'RNA subgenòmic conté només l'ORF2 i l'ORF3 per a la producció de VP1 i VP2, respectivament. En l'encapsidació l'(+)-RNA és empaquetat en nous virions que posteriorment seran alliberats de la cèl·lula hoste infectada, tot i que el mecanisme de com els virus són alliberats no es coneix (Fig. 1.1.5.1) [24][67].

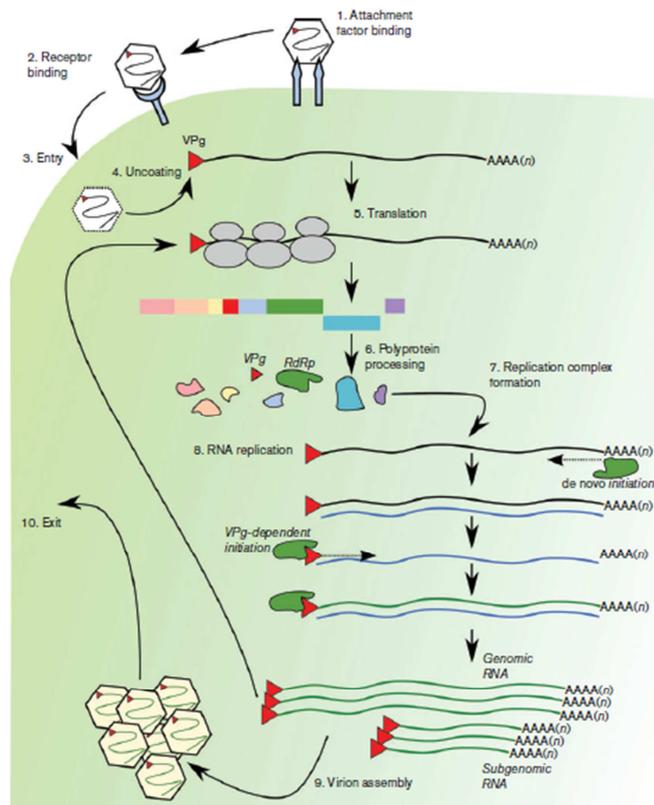


Figura 1.1.5.1. Cicle biològic dels NoV. (1) Els HuNoV i els MNoV s'uneixen a la superfície cel·lular a través de varis factors d'unió de carbohidrats. A més, es creu que es necessita la unió a un receptor de proteïna no identificat (2). Entrada (3) i desencapsidació (4). (5) El genoma es tradueix a través d'interaccions amb VPg en l'extrem 5' (triangle vermell) i la maquinària de traducció cel·lular. (6) La poliproteïna codificada per ORF1 s'escindeix a proteïnes individuals per la proteasa vírica. (7) Es forma el complex de replicació i (8) es replica l'RNA a través d'un intermediari de cadena negativa. L'RNA genòmic i subgenòmic es genera per la RdRp. (9) L'RNA genòmic recent sintetitzat serà traduït o usat per l'empaquetament per a la sortida del virió. Imatge extreta de [24].

1.1.6. Estructura del virió

Gràcies al desenvolupament de les VLPs, l'estructura dels NoV s'ha pogut estudiar per microscòpia crio-electrònica amb una resolució de 22 Å. (Fig. 1.1.6.1). Les partícules víriques madures de calicivirus tenen una càpsida d'uns 27-40 nm de diàmetre, simetria icosaèdrica amb un número de triangulació de 3 (T=3). Tenen un aspecte de petits virus rodons amb depressions en el seu contorn que ha donat lloc al seu nom degut a la semblança a "copes", del llatí "calyx".

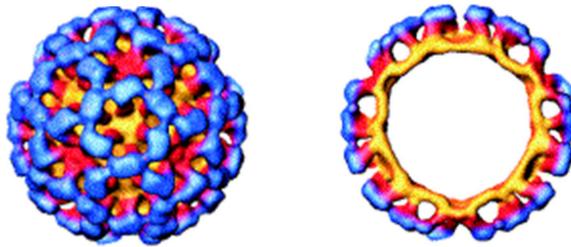


Figura 1.1.6.1. Estructura de VLP del virus Norwalk mitjançant reconstrucció per microscòpia crio-electrònica de 22 Å A la part esquerra: superfície de la càpsida; a la part dreta: secció transversal. El domini S en groc, constitueix la superfície interna del virus, el domini protuberant P és subdividit en els subdominis P1 (vermell) i P2 (blau), essent el P2 el més distal de la superfície de la VLP. Imatge adaptada de [27].

Els virions madurs de NoV estan formats per tres proteïnes: VP1, VP2 i VPg. La proteïna VP1 és la proteïna estructural principal del virus, present en 180 còpies (90 dímers) per virió. Com s'ha explicat en l'apartat anterior (1.1.2), cada dímer forma una protuberància en forma d'arc que s'estén des de la capa interna de la partícula. Cada monòmer de la càpsida té els dos dominis S i P. El predomini de VP1 en la formació de l'estructura de la càpsida viral juga un paper determinant en el fenotip antigènic i en la interacció del virus amb la cèl·lula hoste. La VP2 es considerada la proteïna menor de la càpsida i té un paper en l'estabilitat de la partícula viral.

1.1.7. Epítops descrits de la VP1

Com s'ha comentat en apartats anteriors, la variació antigènica és un factor important que contribueix a l'aparició de noves soques de NoVs. Des de la primera troballa de que els HuNoV reconeixien els HBGAs com a receptors i que els principals epítops es troben dins del subdomini P2 [68], s'han anat identificant els diferents residus aminoacídics implicats en els llocs d'unió amb els HBGAs i/o les molècules d'anticòs. L'evolució de GII.4 és especialment ràpida en determinades posicions aminoacídiques, provocant l'aparició de noves variants epidèmiques que tenen diferent antigenicitat i diferents propietats d'unió a carbohidrats. Degut a que els sistemes de replicació en cultiu cel·lular són encara limitats, no és possible parlar d'epítops i/o d'anticossos neutralitzants i, per identificar els epítops amb més rellevància biològica, s'estudia si diferents anticossos monoclonals tenen capacitat de "bloquejar" *in vitro* la unió de les partícules víriques a diferents carbohidrats i on s'uneixen aquests anticossos. Fruit d'aquests assajos *in vitro* i de diverses prediccions bioinformàtiques, a data d'avui, es coneix que la majoria de variacions observades entre les diferents soques GII.4 responsables de l'aparició de noves variants epidèmiques, estan localitzats en cinc dominis dins del domini P2 de la càpsida: de l'epítop A fins a l'epítop E (Fig. 1.1.7.1. A) [69][70].

L'epítop A es localitza a la part superior de la càpsida proximal al lloc d'unió a HBGA (Fig. 1.1.7.1. B). Sis posicions formen l'epítop A que sembla que funcionen en grup per canviar l'estructura de l'epítop, 294, 296-298, 368 i 372. S'ha vist que l'aminoàcid de la posició 294 varia àmpliament en les soques GII.4 2008-2010. L'epítop B està format per dos residus variables a la posició 333 i 382, que estan amagats a la interfície del dímer. Els residus 340 i 376 constitueixen els residus variables de l'epítop C, que està molt pròxim al lloc d'unió a HBGA. L'epítop D està compost per tres residus variables en les

posicions 393-395 i està molt proper als llocs d'interacció de la càpsida amb els HBGAs. L'epítot E compren els residus 407, 412 i 413, que s'ha vist que varien amb cada soca epidèmica posterior al 2002, suggerint que és un punt clau per a l'aparició de soques immunològicament noves. Una característica interessant d'aquest epítot és la seva ubicació al lateral del lloc d'unió d'HBGA. En lloc d'estar com els altres quatre epítots a la part superior de P2, aquests tres residus es troben al costat de P2 (Fig. 1.1.7.1. B) [69][70][71].

Altres residus adjacents a aquests epítots també podrien afectar l'afinitat dels NoV als HBGA i unir-se a anticossos neutralitzants.

Amb l'acumulació de mutacions en aquests cinc llocs, s'han anat generant noves variants antigèniques de HuNoV amb el potencial d'escapar de la immunitat col·lectiva [35]. En un estudi on es comparava la soca New Orleans 2009 amb la Sydney 2012, hi havia quatre llocs amb noves mutacions, dos d'ells dins de l'epítot A, un a l'epítot C i un quart no associat amb cap dels epítots descrits [38][72]. Mutacions en aquestes posicions doncs van contribuir a l'aparició de la soca Sydney 2012.

A

VLP	Epítotes															
	A					B		C		D			E			
	294	296	297	298	368	372	333	382	340	376	393	394	395	407	412	413
GII.4.1974	G	S	H	D	T	N	L	K	A	Q	D	-	H	N	S	G
GII.4.1987	V	S	H	D	T	N	L	K	A	Q	D	-	H	N	T	G
GII.4.1997	A	S	H	D	T	N	M	K	E	Q	G	-	N	N	T	G
GII.4.2002	A	T	H	N	N	N	M	K	G	E	N	G	A	S	T	G
GII.4.2004	A	A	Q	N	S	S	V	R	R	E	S	T	T	D	D	S
GII.4.2005	P	T	R	T	A	D	M	R	G	E	S	S	T	D	T	V
GII.4.2006	A	S	R	N	S	E	V	K	G	E	S	T	T	S	N	V
GII.4.2009	P	S	R	N	A	D	V	K	T	E	S	T	T	S	N	I

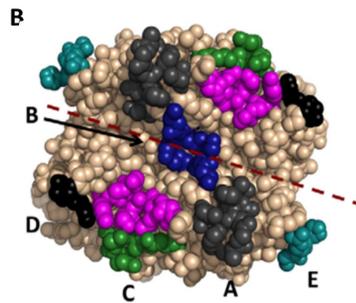


Figura 1.1.7.1. Epítops “bloquejants” identificats en NoV GII.4. **A:** Taula amb les posicions d’aminoàcids rellevants dels epítops A-E de NoV GII.4 on s’observa la seva variació en les diferents variants de GII.4. **B:** Molècula de VLP de GII.4 on en color s’assenyala els diferents epítops predits. Epítop A (gris fosc), Epítop B (blau), Epítop C (verd), Epítop D (negre), Epítop E (turquesa) i en lila els llocs d’unió a HBGA. Imatge adaptada de [69].

1.1.8. Susceptibilitat de l’hoste

Degut a la falta d’un sistema de cultiu cel·lular i d’un model animal durant molt de temps, el coneixement sobre la patogènesi de la infecció i la immunologia prové, principalment, a partir d’estudis histològics, bioquímics i immunològics en voluntaris i pacients afectats. Els primers estudis amb voluntaris infectats amb GI.1, van veure que aproximadament el 13-40% d’aquests no s’infectaven i que només el 50% desenvolupava la malaltia. Van veure també que els individus que no s’infectaven generalment estaven relacionats en famílies, suggerint la influència d’un al·lel de susceptibilitat de l’hoste important en el desenvolupament de la malaltia [73][74].

Així doncs, es coneix que la patogènesi dels HuNoV es caracteritza per interaccions virus-hoste heterogènies. És a dir, no tots els individus són iguals de susceptibles a les infeccions per HuNoV i no tots els genotips de HuNoV poden infectar qualsevol individu [75]. Per exemple, es va veure que individus amb grup sanguini O són més susceptibles a infeccions per GI.1 que individus d’altres grups sanguinis [76].

Aquesta diferent susceptibilitat està associada als antígens del grup histosanguini (HBGA). Els HBGA són carbohidrats complexos units a la part més externa de N- o O-glicans de moltes glicoproteïnes o glicolípidis presents en les cèl·lules epitelials del tracte gastrointestinal i respiratori, en les superfícies dels glòbuls rojos i com a antígens lliures en fluids corporals com la saliva, la sang, la llet i continguts intestinals. Els HBGA són determinants tant del grup sanguini ABO com del fenotip de Lewis (Le) i l'estat secretor. En certs tipus cel·lulars, l' $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa (FUT2), afegeix un grup fucosa als precursors dels HBGA generant els H HBGA i les subseqüents reaccions generen els A HBGA i B HBGA (Fig. 1.1.8.1). Els individus que no tenen el FUT2 es coneixen com a "no secretors" [67]. És a dir, els individus "secretors" tenen els antígens A, B, H Le^b i/o Le^y i pel contrari, els "no secretors" tenen el gen FUT2 inactiu, el que fa que no tinguin els antígens A, B, H Le^b i/o Le^y. No obstant, poden ser positius per Le^a i Le^x com a productes del FUT3, ja que l'antigen de Lewis és determinat per l'expressió de l'enzim $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasa codificada per FUT3 (Fig. 1.1.8.1). L'especificitat d'unió dels HuNoV a diferents HBGA difereix entre genotips i genogrups, donant lloc a diferències en la susceptibilitat dels individus a diferents soques de HuNoV.

Entre la població europea i la nord-americana (caucàsica), s'ha determinat que aproximadament el 80% de la gent és secretora, tenint un al·lel FUT2 actiu, mentre que el 20% restant és no secretora [77]. S'ha demostrat que els no secretors són menys susceptibles a les infeccions per varies soques de GI i GII. Cal destacar que, encara que A, B i H HBGA corresponen als grups sanguinis A, B i O, el sistema de grups sanguini ABO és independent de l'estat secretor, ja que FUT1 sintetitza aquests HBGA a la superfície dels eritròcits enlloc del FUT2 [78]. No obstant, també s'ha vist que individus amb grup sanguini B o AB són menys susceptibles a la infecció amb certes soques de HuNoV en comparació als de grup sanguini A o O [76].

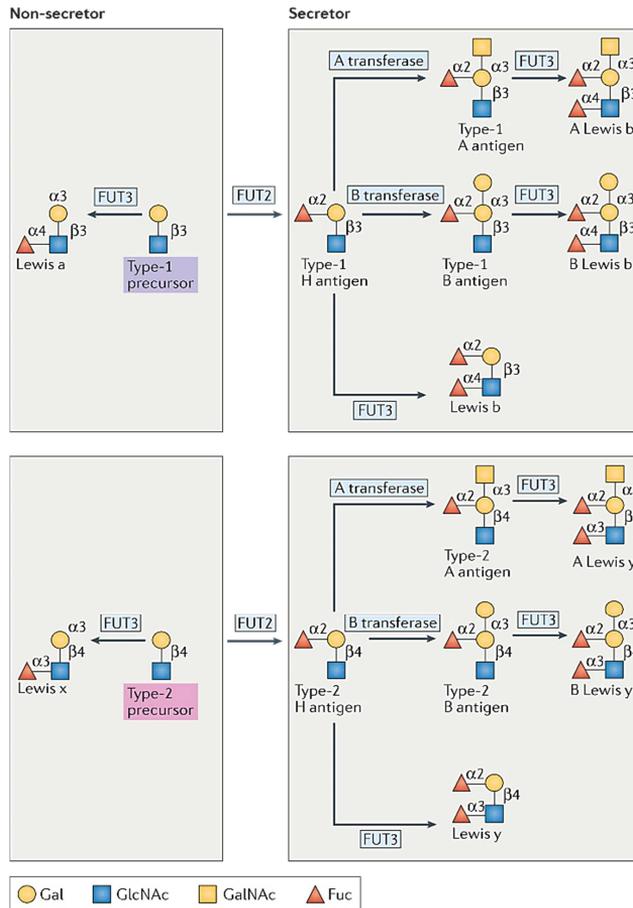


Figura 1.1.8.1. Síntesi dels HBGAs. Els precursors d’HBGA de tipus 1 i 2 són modificats per l’acció d’ $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa 2 (FUT2) per generar H HBGA, que és modificat per A i B transferases donant lloc a A i B HBGA. Els HBGA de Lewis són determinants del sistema del grup sanguini de Lewis i es produeixen quan els HBGA es modifiquen per $\alpha(3,4)$ -fucosiltransferasa (FUT3). Els individus no secretors no disposen d’enzim FUT2 funcional i no produeixen A, B i H HBGA a les seves secrecions corporals. Els individus amb un FUT2 funcional es denominen secretors. Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetylglucosamine. Imatge extreta de [67].

1.1.9. Epidemiologia de les infeccions per HuNoV

1.1.9.1. Vies de transmissió

La via de transmissió dels HuNoV és fecal-oral, ja sigui per la ingesta d’aliments o aigua contaminats, a través del contacte persona-persona, pel

contacte amb fomites, o a través dels vòmits, en que els aerosols generats per aquests faciliten la seva transmissió [79][80][81]. Sovint, els casos primaris en un brot són el resultat d'una d'exposició a menjar o aigua contaminada, mentre que el contacte persona a persona amb algun dels casos primaris propaga l'epidèmia. Entenem com a brot l'existència de dos o més individus afectats amb una clínica similar i relacionats epidemiològicament.

Cal esmentar que els brots representen una part petita de tots els casos, ja que només són aquells que han consultat els serveis sanitaris i dels quals s'ha pogut fer un estudi epidemiològic, notificant-se al servei de salut pública i seguidament investigats.

Vàries característiques dels HuNoV faciliten la seva elevada incidència a la població. Una d'elles és la baixa dosi infectiva, aproximadament de 18 a 1000 partícules virals [82], facilitant que el virus es propagui a través de petites gotes, fomites, contacte persona a persona i per contaminació ambiental, com demostren les taxes d'atac secundari del 30% o més entre contactes propers [79]. Un altre fet és l'excreció viral, la qual en individus sans comença just abans de l'inici dels símptomes i pot durar dues setmanes després de la fase simptomàtica, amb una disminució dels valors d'excreció. Aquesta excreció després de la finalització dels símptomes fa augmentar el risc potencial de disseminació secundària, fet important a tenir en compte entre els manipuladors d'aliments i/o cuidadors [79][83]. S'ha descrit que en pacients hospitalitzats o residents en institucions geriàtriques excreten virus durant un període de temps més elevat [84][85].

Una altra característica és la seva resistència a diferents agents físico-químics. Estudis realitzats amb suspensions de femtes del virus Norwalk, han demostrat que el virus manté la seva capacitat d'infecció sobre voluntaris després de sotmetre aquestes a: pH 2.7 durant 3 hores a temperatura ambient, tractament amb èter al 20% a 4°C durant 18 hores o incubant a 60°C durant 30 minuts

[86]. A més, és resistent a la inactivació després de tractaments amb concentracions d'entre 3.75 i 6.25 mg/l de clor (clor lliure residual 0.5 a 1.0 mg/l), unes quantitats suficients per a inactivar altres virus entèrics i habituals en una aigua potable de consum [87][88]. No obstant, s'inactiva amb 10 mg/l de clor lliure que seria la concentració usada quan es detecta una contaminació en el sistema de distribució d'aigua [87][23]. Aquestes dades posen en manifest l'elevada estabilitat ambiental dels NoV, que permet que la contaminació de superfícies per part dels individus infectats sigui molt fàcil per una exposició inconscient.

1.2.9.1.1. Brots transmesos per aliments

La contaminació dels aliments pot tenir lloc durant el cultiu, la collita, el processament, distribució o preparació. Hi ha una gran diversitat d'aliments que poden ser el vehicle per als HuNoV, entre els quals tenen especial importància les ostres i mol·luscs bivalves, entrepans, amanides i maduixes. En el cas de les ostres i mol·luscs degut a que són animals filtradors, si les aigües estan contaminades concentren gran quantitat de partícules víriques i, al ser consumits crus o després d'un tractament tèrmic lleu, el qual no elimina la infectivitat del virus, suposen un gran risc [89]. Són doncs, una de les causes majoritàries de brots alimentaris. En el cas de les amanides i maduixes, poden estar contaminats ja en el seu origen degut a que han estat regats amb aigües contaminades amb matèria fecal humana o, com amb el cas dels entrepans, els manipuladors d'aliments infectats han manipulat els aliments, que no passaran per un procés de cocció, sense cures higièniques [90][91].

Degut a que l'excreció de virus en una persona infectada pot produir-se abans de l'inici dels símptomes i quan roman asimptomàtica, la contaminació d'aliments a través d'un manipulador que no compleix amb les normes higièniques és molt difícil d'evitar. A més, l'excreció pot prolongar-se fins i tot

setmanes o mesos després de la recuperació. Per això, cal una bona formació en mesures i cures higièniques a tot el personal per poder evitar o reduir el risc de propagació.

El brot d'origen alimentari documentat de majors dimensions es va produir a Alemanya l'any 2012, va afectar més de 11,000 individus de diferents escoles, i va associar-se al consum de maduixes congelades importades de la Xina [92].

1.2.9.1.2. Brots transmesos persona a persona

L'altre via de transmissió és a través del contacte amb un individu infectat. Per les característiques dels HuNoV de baixa dosi infectiva i la resistència mediambiental, són freqüents en institucions semi-tancades o tancades com llar d'infants, col·legis, hotels, hospitals, centres socio-sanitaris i residències d'avis [93]. Les infeccions per HuNoV en hospitals i residències geriàtriques són força freqüents i s'associen amb altes taxes d'atac [94], podent ser la infecció en aquests individus molt debilitant. Per aquesta raó, és de gran importància que les residències geriàtriques adoptin mesures de control estrictes tan aviat com aparegui els primers casos.

Els HuNoV es coneixen també com els virus dels creuers, perquè són molt habituals els brots per HuNoV en aquests tipus de viatges [95][96], ja que en espais tancats on hi conviu molta gent la transmissió persona a persona és molt fàcil. De vegades, d'un brot d'origen alimentari, la propagació persona a persona dels casos primaris propaga l'epidèmia.

A part del contacte a través de la mà-boca, aquest tipus de transmissió també es pot donar per partícules aèries dels vòmits o per superfícies contaminades [81][97]. La detecció de material genètic de HuNoV en superfícies s'ha correlacionat amb brots recurrents en varis entorns [98].

1.2.9.1.3. Brots transmesos per aigües

Els brots associats a aigua de beguda son menys freqüents que els transmesos per aliments, sobretot en països desenvolupats. No obstant, s'han descrit brots per consum d'aigües de fonts, de pous o alguns d'aigua embotellada [99][100] i alguns relacionats amb aigües recreatives. Alguns estudis suggereixen que les soques de GI s'associen amb major freqüència amb els brots hídrics que GII [101].

La contaminació de les aigües de consum o d'oci pot ser degut a filtracions en els sistema de clavegueram, per inundacions i pluges torrencials o per defectes en el sistema de cloració [102]. Un dels brots de majors dimensions es va produir a Catalunya l'any 2016, quan més de 4,000 individus van adquirir la infecció pel consum d'aigua embotellada procedent d'un manantial d'Andorra [100].

Ressalta doncs, la importància de processos de tractament de l'aigua per a reduir la contaminació viral, ja que els virus entèrics són considerablement més resistents als diversos tractaments de l'aigua que els bacteris coliforms.

1.1.9.2. Incidència i vigilància epidemiològica

Globalment, s'estima que són la causa més comú de GEA, afectant a qualsevol grup d'edat i essent responsable de 684 milions de casos anuals [3]. Els HuNoV són un problema tant en països de baixos ingressos com en els d'alts ingressos, i s'estima que cada any costen 60,000 milions de dòlars, principalment per atenció mèdica i per a la pèrdua de productivitat [103]. Pel que fa a l'estacionalitat, els brots per HuNoV alguns tenen lloc durant tot l'any, però són més prevalent en els mesos freds en climes temperats [104].

A nivell mundial, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va fer un informe, publicat l'any 2015 sobre l'impacte de malalties de transmissió alimentària causades per 31 agents incloent bacteris, virus, paràsits, toxines i productes químics. L'any 2010, aquets 31 agents havien causat 600 milions de malalties

transmeses pels aliments i 420,000 morts. Els agents infecciosos que causaren malalties diarreiques representaren la gran majoria (550 milions), en particular els HuNoV causant 120 milions de casos.

L'OMS estima que a nivell Europeu els HuNoV són la causa més comú de malaltia transmesa pels aliments, amb uns 15 milions de casos cada any causant més de 400 morts [105].

Des de 1999, a nivell europeu existeix una xarxa de vigilància epidemiològica de HuNoV, anomenada NoroNet, que és una continuació de la xarxa FBVE (*Foodborne Viruses in Europe*), de viròlegs i epidemiòlegs de 13 països europeus. En aquesta xarxa es comparteixen dades de vigilància i investigació sobre infeccions provocades per virus entèrics, sobretot per HuNoV.

Als EEUU existeixen tres xarxes de sistema de vigilància; *National Outbreak Reporting System* (NORS), CaliciNet i *Norovirus Sentinel Testing and Tracking* (NoroSTAT). En el cas de NORS és una plataforma web inaugurada al 2009 pel *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) per recopilar informació sobre brots transmesos per aigua, aliments i persona a persona. CaliciNet és una xarxa nacional de vigilància de brots per HuNoV, on els laboratoris de salut pública envien les dades epidemiològiques dels brots i les seqüències de les soques de HuNoV, d'aquesta manera es poden vincular els brots a una font comú, monitoritzar les soques que circulen i identificar-ne les emergents.

Per últim, NoroSTAT es va establir al 2012 com una xarxa col·laborativa de nou departaments de salut estatals i la CDC, per treballar junts i establir i mantenir pràctiques per a la notificació de brots de HuNoV en els sistemes de vigilància de la CDC.

Aquestes xarxes de vigilància i bases de dades especialitzades permeten traçar la propagació global, reconèixer els canvis a les soques que circulen, etc., per tal

d'ampliar el coneixement sobre les tendències geogràfiques i temporals en l'aparició i propagació de variants. Un exemple n'és el l'article de van Beek *et al.* [31], on es van analitzar 16,635 seqüències de HuNoV enviades d'entre gener de 2005 i novembre de 2016 a la xarxa NoroNet. Un altre exemple és l'article de Cannon *et al.*[32] en que es van analitzar 2,715 brots de HuNoV notificats a la xarxa CaliciNet des de setembre de 2013 fins agost de 2016. Aquesta vigilància mundial proporciona una visió completa de les soques de HuNoV circulants.

A Catalunya, les dades publicades al Butlletí de Vigilància en Salut Pública del 2015, s'informa que durant el període 2006-2013 es van notificar 315 brots de GEA per HuNoV [106]. Els brots es donaren amb més freqüència en l'àmbit de l'hostaleria, a les residències de gent gran i en l'àmbit sociosanitari, evidenciant la freqüència d'aquests brots en institucions amb població vulnerable on l'afectació lleu pot donar lloc a complicacions.

1.1.9.3. Importància clínica i diagnòstic

El període d'incubació dels HuNoV és curt, d'unes 12-48 hores i la simptomatologia es resol normalment en unes 12-72 hores. Les manifestacions clíniques són nàusees, vòmits, diarrea sense sang, dolors abdominals i en alguns casos febre i cefalea. S'ha vist que els vòmits són més comuns en nens mentre que en adults ho és la diarrea [79][107][108]. Aquestes característiques van permetre a Kaplan *et al.* [109] proposar uns criteris per a la identificació de brots de gastroenteritis associats a HuNoV negatius per a bacteris: (a) que no es detectin patògens bacterians ni paràsits; (b) que hi hagi un començament brusc dels símptomes després de 24-48 hores d'incubació; (c) vòmits en el 50% dels afectats i (d) amb una durada mitjana de la malaltia de 12-60 hores [109]. En absència de resultats de diagnòstic de laboratori dels individus afectats en un

brot, es pot determinar l'associació etiològica amb HuNoV quan es compleixen aquests criteris de Kaplan.

Encara que la gastroenteritis produïda per HuNoV es considera autolimitant, pot produir incapacitat durant la fase de símptomes i, tant en individus d'edat avançada, en infants com en immunodeprimits, pot ser suficientment severa com per a provocar l'hospitalització i, fins i tot, en algun cas la mort [110][111][112][113]. Hi ha excreció de virus força temps després de la recuperació de la malaltia [114] i l'excreció viral pot ocórrer en individus asimptomàtics [115][116][117]. Aquest fet és d'alta importància ja que manipuladors d'aliments i/o cuidadors, si no tenen unes cures idònies d'higiene poden ser la font de brots de HuNoV [118][119][120]. En l'estudi publicat al 2016 per Hall *et al.* [121] notificaren que de tots els brots transmesos per aliments els treballadors estaven implicats en el 70%.

Fins al 1993, l'únic mètode que hi havia disponibles per al diagnòstic de les infeccions per HuNoV era la microscòpia electrònica. Actualment, la RT-PCR convencional i la RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) són les tècniques més emprades per a la detecció i diagnòstic junt amb mètodes immunoenzimàtics. Mitjançant RT-PCR i qRT-PCR es pot detectar el virus en mostres clíniques i en aigua i aliments contaminats, així com en fomites. La RT-PCR junt amb la seqüenciació per Sanger permet caracteritzar les soques i traçar l'origen del brot. Les característiques d'alta sensibilitat, especificitat i rendiment de la qRT-PCR permet una detecció més ràpida i a més quantificar els nivells de HuNoV de les mostres. Aquestes tècniques són les usades de manera habitual i rutinària per a la caracterització i l'estudi molecular dels HuNoV.

Actualment existeixen kits comercials de diagnòstic (com ara els de CerTest, Monlab, R-Biopharm, entre d'altres) basats en immunocromatografia d'un sol pas per a la detecció de HuNoV en femtes i poder realitzar un diagnòstic

presumtiu d'infecció per HuNoV. A més, també existeixen kits comercials de RT-qPCR senzills i ràpids d'usar per a la detecció múltiple de GI i GII.

1.1.9.4. Control de la infecció i tractament

No hi ha mètodes específics per a la prevenció de la infecció per HuNoV. El desenvolupament d'una vacuna per HuNoV s'ha considerat molt difícil per varies raons. La immunitat contra HuNoV és complexa i de curta durada. A més, la diversitat antigènica, al coneixement limitat sobre la immunologia del virus i el seu cicle, la falta d'una línia cel·lular permissiva pel seu cultiu i un model animal àmpliament disponible i exitós, ha dificultat el seu desenvolupament. Durant molt de temps s'han dedicat esforços en el desenvolupament d'una vacuna efectiva i avui dia no existeix encara una vacuna per HuNoV autoritzada, tot i que hi ha algunes candidates en desenvolupament en les etapes preclíniques [125].

Així doncs, el control dels brots es basa en impedir que es propagui el virus des dels individus infectats a través de mesures com el rentat de mans freqüents amb aigua i sabó, especialment després d'anar al lavabo o canviar bolquers. Tenint en compte l'elevada freqüència en que els HuNoV s'associen a brots alimentaris, s'ha de tenir unes correctes mesures higièniques abans de preparar o manipular aliments. Un dels aliments que més actua com a vehicle per a la infecció de HuNoV són els mol·luscs bivalves, per això un bon procés de cocció disminueix el risc. Degut a que les ostres es consumeixen crues, cal un bon control de les plataformes de cultiu.

En el cas de centres tancats com les residències d'avis, en l'inici d'un individu afectat, per tal d'evitar la propagació, seria necessari netejar i desinfectar amb una solució amb clor les superfícies i la roba després d'un episodi de vòmits o diarrea.

No hi ha un tractament específic per a les infeccions per NoV. Com s'ha esmentat en l'apartat anterior, és una GEA que en la població sana es resol sense complicacions. El tractament es basa en prevenir la deshidratació i la reposició d'electròlits per via oral. En alguns casos, en avis, infants o immunodeprimits, s'ha requerit l'hospitalització per una greu deshidratació, en que aleshores és necessària la via parenteral.

1.2. L'HEPATITIS A

Les primeres dades que es coneixen "d'icterícia epidèmica" corresponen a Hipòcrates i a l'antiga Xina [122]. Els símptomes descrits inclouen l'aparició brusca de malestar, nàusees, anorèxia, poca febre, dolor abdominal i enfosquiment de l'orina. No obstant, aquestes i altres descripcions posteriors poden correspondre's amb malalties diferents. Els primers brots descrits d'hepatitis que es consideren deguts al virus de l'HAV van tenir lloc a Europa durant els segles XVII i XVIII i afectaren a varis exèrcits rebent la malaltia noms diversos. A mitjans del segle XIX la malaltia era coneguda com a "icterícia catarral" per la creença de que era deguda a la inflamació del tracte biliar com a conseqüència de l'obstrucció mecànica del conducte biliar. La primera hipòtesi de la implicació d'un virus en l'etiologia d'aquest quadre clínic es correspon a principis del segle XX. Uns anys després, s'especulava amb el diferent origen de la "icterícia catarral" i de "l'hepatitis sèrica", descrita aquesta última a mitjans del segle XIX. Al 1947 MacCallum proposà que es diferenciessin en hepatitis A i hepatitis B [123], i al 1973 Feinstone va observar en femtes de voluntaris infectats i gràcies a la microscòpia electrònica, partícules d'uns 28 nm que es corresponien als virions de l'HAV [124].

Actualment existeixen set tipus d'hepatitis vírica: A, B, C, D, E, F i G, produïdes per varis agents vírics englobats en diferents famílies de virus, tot i que els dos

últims es coneixen poc. La malaltia produïda pel HAV té una distribució global, donant lloc a casos esporàdics i brots de diverses dimensions. La infecció és freqüent en nens en què la majoria de casos és asimptomàtica, però a mesura que augmenta l'edat de l'individu infectat, la severitat dels símptomes augmenta requerint alguns casos la hospitalització. S'han registrat casos de mort per fallada hepàtica fulminant, especialment en casos de co-infecció amb virus de l'hepatitis B i/o una afectació hepàtica subjacent.

L'hepatitis A és una malaltia d'importància per a la salut pública catalogada com a malaltia de declaració obligatòria, no només pels símptomes sinó per l'elevada facilitat de transmissió, ja que una de les característiques de l'HAV és l'elevada resistència al medi ambient sumant el fet que el virus s'excreta en femtes des d'una-dos setmanes abans de l'inici dels símptomes.

1.2.1. El virus de l'hepatitis A

L'HAV és un virus d'RNA de cadena senzilla i polaritat positiva, de mida de 30 nm i d'estructura icosaèdrica. Forma part de la família *Picornaviridae* (del llatí: "pico" de petits, "rna" del seu genoma d'RNA) que consisteix en 80 espècies agrupades en 35 gèneres [125]. Fins recentment, es creia que era l'únic representant del gènere *Hepatovirus*, però actualment s'han descobert 13 espècies d'*Hepatovirus* en diversos mamífers petits, pertanyents als ordres *Rodentia*, *Chiroptera* i *Eulipotyphla* [126]. Clàssicament se l'havia considerat com a virus nu, però als últims anys s'ha descrit que el virus surt de la cèl·lula embolcallat amb membranes, que el protegeixen de la neutralització per anticossos podent circular així per a la sang [127]. Aquestes membranes no contenen glicoproteïnes codificades pel virus i per això se les considera partícules pseudoembolcallades (eHAV). Es creu que durant l'excreció, el virus perd l'embolcall, trobant-se en la forma nua en femta, que és molt estable a pH baixos i resistent a la calor i dessecació, fet que li dona al virus alta resistència

al medi ambient [128]. La característica de pseudoembolcallat per la sang i nu però resistent a l'ambient li aporten una major capacitat de transmissió [129].

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, l'HAV es transmet per via fecal-oral i juntament amb els HuNoV, l'HAV és el virus detectat amb major freqüència en brots de malalties transmeses pels aliments. Tot i que l'hepatitis A té una infecció més comú en els països en desenvolupament, en molts països desenvolupats la introducció del virus té lloc a través del consum d'aliments importats, viatges o fluxos d'immigració. Els homes que tenen sexe amb altres homes (*men-having-sex-with-men*, MSM) constitueixen un grup d'alt risc per a l'hepatitis A i en les últimes tres dècades s'han notificat brots periòdics d'hepatitis A afectant aquest grup [130][131].

1.2.2. Organització genòmica

L'HAV presenta una organització genòmica similar a la resta de membres de la família *Picornaviridae*. El seu genoma RNA és d'unes 7.5 Kb i se li poden diferenciar les regions 5' i 3' no codificants, la regió P1 que codifica per a les proteïnes estructurals VP0, VP3 i VP1 i les regions que codifiquen per les proteïnes no estructurals, la P2 i P3 necessàries per a la replicació del virus (Fig. 1.2.2.1).

La regió 5'NCR és la regió més conservada, amb uns 700 nucleòtids a l'extrem 5' del genoma en el que es troba unit la proteïna VPg que actua com a encebador per a la síntesi de l'RNA víric. No obstant, tot i ser la regió més conservada, conté una regió variable rica en pirimidines i l'IRES (lloc intern d'entrada del ribosoma). L'IRES de l'HAV és del tipus III, que és altament ineficient dirigint la traducció comparat amb altres IRES d'altres picornavirus [132][133].

Per a l'inici de la traducció, l'IRES és reconegut pel ribosoma i altres factors cel·lulars que iniciaran la traducció a partir d'un dels dos codons de l'inici, normalment el segon [134].

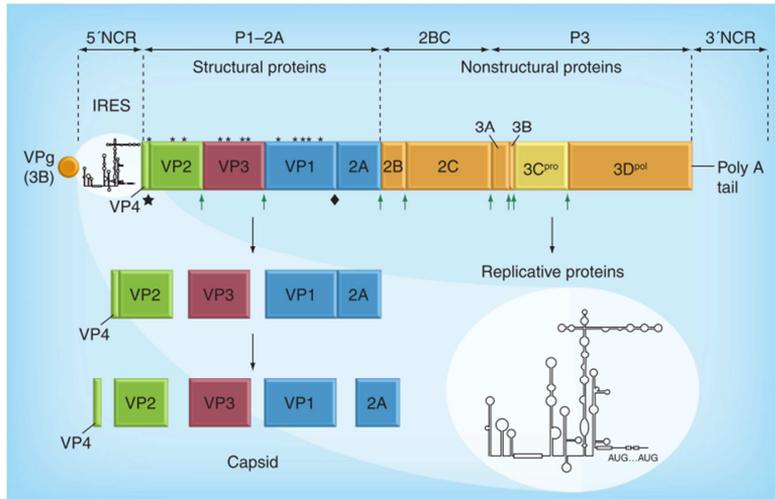


Figura 1.2.2.1. Organització genòmica de l'HAV i processament de la poliproteïna. La proteasa vírica (3C) talla els punts indicats amb fletxes verdes. Una proteasa cel·lular, indicat en forma de diamant, talla 2A de la càpsida i en estrella s'indica el tall entre VP4 i VP2 d'una activitat proteolítica desconeguda. Imatge extreta de [135].

La regió codificant conté un únic ORF que codifica per una poliproteïna de 2.227 aminoàcids (soca HM175). Aquesta està formada per les regions P1, P2 i P3 i és processada donant lloc a les proteïnes víriques madures (Fig. 1.3.2.1). Tots els talls proteolítics són realitzats per la proteasa vírica 3C^{pro} (codificada a la regió P3) menys el tall entre VP1 i 2A que es creu que és degut a l'acció de proteases cel·lulars (encara per identificar) [136] i en el tall de la VP0 donant lloc a VP4 i VP2 que és degut a una activitat proteolítica desconeguda.

La regió P1 codifica per a les proteïnes estructurals VP4, VP2, VP3 i VP1. La regió VP4, a diferència dels altres picornavirus, no està miristilada i és extremadament petita (uns 23 residus) però necessària per a la formació del virió. No quedava clar si estava present en les partícules víriques madures [137]

però recentment mitjançant cristal·lografia de raig X s'ha detectat VP4 en virions madurs [138]. La regió P2 comprèn les regions 2A, 2B i 2C. La 2A és necessària per a la formació del pentàmer i té funció estructural [139] i les regions 2B i 2C s'ha observat que són importants per a l'adaptació del virus a la replicació en cultiu cel·lular [140]. La regió P3 està dividida en 3A, 3B, 3C i 3D. La 3B codifica per a la proteïna VPg, la 3C codifica per a la proteasa (responsable de la majoria dels talls postraduccional) i la regió 3D per a la polimerasa. La funció de 3A no és coneguda. La regió 3'NCR té una longitud de 40 a 80 nucleòtids i acaba amb una cua poli-A.

1.2.3. Classificació

Inicialment es va classificar com a *Enterovirus 72* (dins la família *Picornaviridae*) però per les característiques que el diferencien de la resta de picornavirus es va classificar més tard dins d'un nou gènere, l'*Hepatovirus* [124].

Malgrat la baixa variabilitat antigènica de l'HAV, presenta un grau de variabilitat genètica similar al dels altres picornavirus. Aquesta variabilitat permet la diferenciació de diferents genotips i subgenotips del virus mitjançant l'anàlisi de seqüència de nucleòtids de diferents regions del genoma víric, principalment de la regió codificant de la càpsida (P1) o la unió entre aquesta i la regió contigua no estructural (P2) [6]. En particular, les regions més usades són l'extrem carboxi-terminal (C-terminal) de la proteïna estructural VP3, l'extrem amino-terminal (N-terminal) de la proteïna estructural VP1, la regió d'unió entre VP1 i la proteïna no estructural 2A (VP1/2A), la regió que engloba des de l'extrem C-terminal de VP1 fins l'extrem N-terminal de la proteïna no estructural 2B (VP1/P2B), i finalment la regió completa de la proteïna VP1 (Fig. 1.2.3.1) [141][135]. No obstant, s'han identificat algunes variants antigèniques del virus que afecten residus no inclosos en les seqüències genòmiques parcials comentades, pel que s'ha recomanat l'ús de seqüències més llargues que cobreixin al menys la regió completa de la proteïna VP1 incloent la seva unió

amb 2A [142]. Malgrat això, la regió VP1/2A és la regió més utilitzada per a la diferenciació dels diferents genotips i subgenotips de l'HAV. En aquesta regió, s'han definit inicialment 7 genotips, amb una variabilitat nucleotídica major del 15%, mesura com a variació nucleotídica [142].

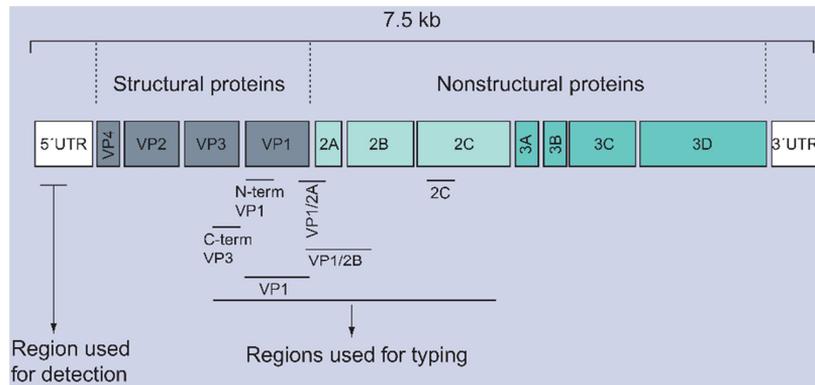


Figura 1.2.3.1. Regions del genoma que s'utilitzen per a l'anàlisi genètic d'HAV. Imatge adaptada de [141].

Després de redefinir aquesta classificació mitjançant l'addició de noves seqüències, es va limitar el número de genotips als 6 existents actualment [143], de l'I al VI, la distància genètica dels quals a la regió VP1/2A (que és molt variable) és de >15% de variació nucleotídica [142]. Els genotips I, II i III afecten a humans i es divideixen en subgenotips: el genotip I en A, B i C i els genotips II i III en A i B, definits per una divergència nucleotídica del 7-7.5% [144][6], mentre que els genotips IV, V i VI afecten a simis.

1.2.4. Evolució de l'HAV

Com s'ha comentat anteriorment, els virus RNA presenten una alta taxa de mutació deguda a la manca d'activitat correctora de la RdRp. Com les taxes de replicació dels virus són molt altes, les seves poblacions estan formades per un gran nombre d'individus. Donada l'elevada taxa de mutació juntament amb l'alta taxa de replicació, és impossible que la progènie d'un individu RNA sigui

idèntica al genoma parental. Les poblacions de virus RNA estan formades per complexes distribucions de mutants diferents, però relacionats, anomenats quasiespècies. Una quasiespècie es defineix com a un conjunt de genomes virals propers genèticament que interactuen entre ells i sobre els quals actua la selecció natural. Aquestes poblacions de genomes no idèntics representen un gran reservori de variants biològiques, que confereixen als virus RNA una gran capacitat d'adaptació a diferents ambients [145].

L'anàlisi de seqüències de diferents regions del genoma de l'HAV en diferents poblacions ha mostrat que consisteix en una distribució de mutants, fet que demostra que el virus de l'hepatitis A també replica seguint una dinàmica de quasiespècies [146]. Aquesta dinàmica de quasiespècies està caracteritzada per la generació contínua de variants de genomes virals, on existeix competència, cooperació i interferència entre ells i la posterior selecció conjunta de mutants més adaptats en un ambient particular [145]. Per tant, les quasiespècies víriques no són una simple col·lecció de mutants diversos, sinó un grup de variants que interactuen.

Mentre que segons el model clàssic darwinianà, la seqüència majoritària seria la que predomina a una població, per proliferar més eficientment sota les condicions que viu. En canvi, en una quasiespècie no existeix un genoma definit de forma precisa, sinó una seqüència consens que representa la mitjana de tots els mutants (Fig. 1.2.4.1).

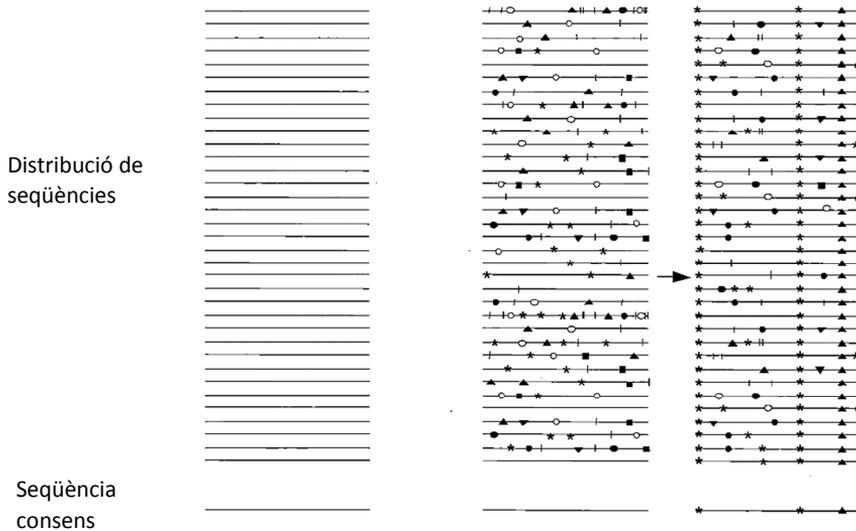


Figura 1.2.4.1. Representació esquemàtica de quasispècies víriques. Els genomes individuals es representen mitjançant ratlles horitzontals i els símbols representen mutacions. La distribució de l'esquerra és homogènia, mentre que les altres són genèticament heterogènies, com en les quasispècies víriques. Les línies inferiors representen la seqüència consens de la població, la que s'obté després d'assignar a cada posició el residu més freqüent en la distribució. La distribució del centre i la de l'esquerra tenen la mateixa seqüència consens. La fletxa indica la formació d'una nova distribució a partir d'un dels genomes de la distribució central, ja sigui degut a un *genetic drift* o a un procés selectiu. Aquesta nova distribució es caracteritza per presentar una seqüència consens diferent, degut a les mutacions que hi havia al genoma original. Imatge adaptada de [147].

La variabilitat de nucleòtids de l'HAV és similar a altres picornavirus, però la diversitat a nivell d'aminoàcid és limitada, fet que suggereix l'existència de restriccions estructurals i biològiques de la càpsida que impedirien l'aparició de nous serotips, existint així un únic serotip, fet diferencial en relació als altres picornavirus [135].

1.2.5. Cicle biològic i cicle cel·lular

El cicle biològic de l'HAV en l'hoste s'inicia normalment per la ingestió del virus i, un cop a l'aparell digestiu, el virus probablement replica a nivell de mucosa estomacal o intestinal per tal d'amplificar l'inòcul [148]. Seguidament, el virus

arriba al torrent sanguini, produint una fase de virèmia. Com el virus accedeix al torrent sanguini no està del tot clar, però estudis *in vitro* amb cèl·lules epitelials intestinals polaritzades suggereixen que l'HAV surt per la membrana apical, pel que segons aquests resultats, un cop replicat a l'intestí el virus seria excretat al lumen intestinal [149]. S'han plantejat dos models per a explicar el pas del virus al torrent sanguini. Un model seria la transcitosi del virus a través de les cèl·lules M (enteròcits especialitzats en la captació d'antígens luminals a les plaques de Peyer), com passa amb poliovirus [149][150]. El segon model consistiria en la transcitosi de partícules víriques associades a IgA, mitjançant el receptor polimèric d'immunoglobulines (pIgR) [151]. Aquests dos models però, foren proposats anteriorment al descobriment de la forma eHAV. Estudis recents amb cèl·lules epitelials intestinals polaritzades *in vitro* confirmen que el virus surt a través de la membrana apical però en forma de partícula eHAV, això faria replantejar els models descrits anteriorment [152]. Un cop al torrent sanguini, a través de la circulació portal hepàtica arriba al seu òrgan diana, el fetge, penetra als hepatòcits on replica massivament [153].

El mecanisme pel qual el virus arriba fins a fetge té molts interrogants, no obstant, el model acceptat fins al moment es basa en l'existència d'un cicle enterohepàtic. La progènie vírica és secretada per l'hepatòcit a través dels canalicles biliars des d'on arriba a les vies biliars i novament a l'intestí. Des d'aquí els virus poden ser excretats en la femta o bé reabsorbits i transportats de nou cap al fetge, el que constitueix un cicle enterohepàtic, que continua fins que els anticossos neutralitzants o altres mecanismes l'interrompen [151][154].

La descoberta de la forma eHAV del virus ha fet que hi hagi un canvi en la comprensió de la seva biologia. La forma eHAV podria afavorir la persistència del virus en sang degut a que aquestes partícules no serien neutralitzades pels anticossos anti-HAV. Aquests eHAV haurien sortit a través de la membrana

basolateral de l'hepatòcit. Segons aquest nou model, les partícules nues excretades en femta podrien provenir o de les eHAV que perdrien l'embolcall al sortir per la membrana apical de l'hepatòcit degut a l'acció de les sals biliar o podrien sortir com a partícules nues usant algun mecanisme independent. Les eHAV facilitarien la propagació del virus entre els hepatòcits ja que la infecció es podria donar mitjançant la fusió de membranes. [155].

Independentment de la via d'entrada que el virus utilitzi, i un cop finalitzada la desencapsidació, al tenir un genoma RNA de polaritat positiva, es comporta com a un mRNA essent traduït en el citoplasma de la cèl·lula. Fruit d'aquesta traducció, es genera la polimerasa i es replicarà el genoma. Durant la replicació del genoma, l'(+)-RNA és transcrit a RNA de polaritat negativa que s'usa com a motlle per a la síntesi de nous genomes vírics que serviran per a començar nous cicles de replicació i/o per sintetitzar més proteïnes víriques (Fig. 1.2.5.1). La replicació del genoma víric es duu a terme en complexes de replicació que consisteixen en membranes cel·lulars reordenades que contenen proteïnes víriques i cel·lulars. Aquests complexes s'han descrit com xarxes vesículo-tubulars i existeix controvèrsia amb el seu origen, o bé deriven del reticle endoplasmàtic o de la membrana mitocondrial externa [156][157].

El mecanisme de traducció que utilitza l'HAV és cap-independent gràcies a l'IRES situat a la regió 5' NCR, que permet reclutar les subunitats ribosomals i els factors necessaris per la formació del complex d'iniciació de la traducció. L'IRES que presenta l'HAV és del tipus III, poc eficient en dirigir la traducció. A més, l'HAV necessita el factor de traducció eIF4G intacte i això fa que no pugui silenciar la síntesi proteica de la cèl·lula hoste i que hagi de competir amb ella per la maquinària traduccional [133][158]. L'HAV ha adoptat una estratègia de traducció diferent per minimitzar-ho que consisteix en l'ús de codons deoptimitzats respecte als de la cèl·lula hoste. Els codons rars que fa servir

l'HAV són aquells que s'aparellen amb tRNAs poc abundants per a la cèl·lula i que per tant els tRNA que estan a baixes concentracions. Aquesta estratègia de fer servir més els codons que no fa servir gaire la cèl·lula per tal de minimitzar la competència amb la cèl·lula hoste pot ser un dels factors que contribueixen a la lenta replicació i baixa productivitat del virus [159][160].

La traducció dona lloc a una única poliproteïna que es processada co- i post-traduccionalment. La poliproteïna del virus es escindida per la proteasa 3Cpro primerament entre 2A i 2B donant lloc a P1-2A que s'ensambla com a pentàmer i es processada per 3Cpro a VP0, VP3 i VP1-2A. Seguidament, té lloc el tall de VP1-2A dut a terme per proteases cel·lulars i s'allibera la proteïna VP1 madura. La VP0 és escindida per una activitat proteolítica desconeguda, originant VP4 i VP2 que dona lloc als virions madurs incrementant la seva infectivitat [161].

En la formació de la càpsida, la proteïna 2A intervé en l'assemblatge dels protòmers per a formar els pentàmers.

El mecanisme de sortida del virus sembla dependre del tipus de cèl·lula infectada. En els estudis més recents realitzats amb hepatòcits humans polaritzats *in vitro* es va definir que la sortida estaria equilibrada entre la membrana apical i la membrana basolateral [152]. Els mecanismes tant d'entrada com de sortida del virus de l'HAV continuen sent objecte de controvèrsia i investigació.

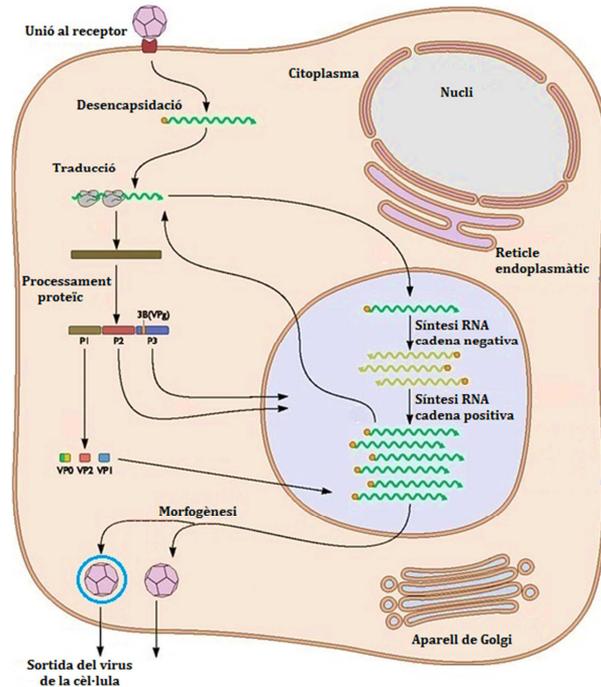


Figura 1.2.5.1. Esquema del cicle d'HAV. Imatge adaptada de [162].

1.2.6. Estructura del viriό

La càpsida de l'HAV, de simetria icosaèdrica, està formada per les proteïnes VP1, VP2, VP3 i VP4. La unitat bàsica de la càpsida és el protómer, el qual conté una còpia de cada una d'aquestes proteïnes i presenta un coeficient de sedimentació de 5S (Fig. 1.2.6.1). Els protòmers s'uneixen de 5 en 5 per a formar els pentàmers, de coeficient de sedimentació de 14S. La unió de 12 pentàmers dona lloc a una càpsida buida de 70S. Posteriorment, un cop s'incorpora l'RNA es realitza el tall de VP0 a VP2 i VP4 per a formar el virus infecciós de coeficient de sedimentació de 150S.

Igual que altres picornavirus, la càpsida de l'HAV està formada per 60 protòmers amb un número de triangulació de 3 ($T=3$). Recentment, s'ha obtingut l'estructura cristal·logràfica de l'HAV [138].

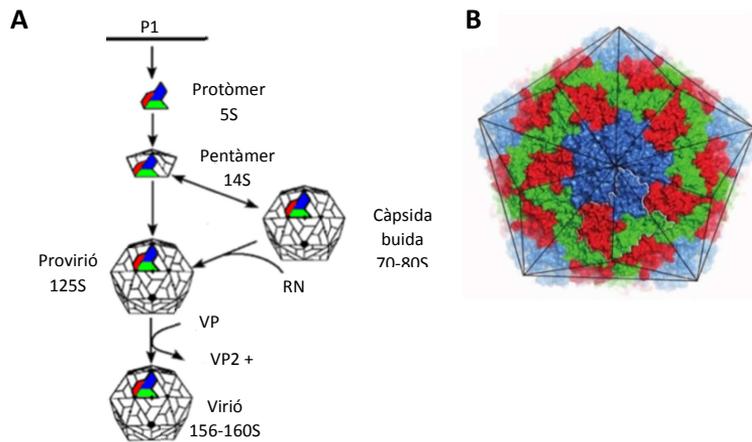


Figura 1.2.6.1. Estructura icosaèdrica de la càpsida dels picornavirus. **A:** Formació de la càpsida vírica a partir d'un protòmer format per una còpia de cada una de les proteïnes VP1, VP2, i VP3. Imatge adaptada de [162]. **B:** Superfície accessible de l'HAV. Les línies negres representen els diferents costats de l'icosaedre. Imatge extreta de [138]. En ambdues imatges en blau es representa VP1, en verd VP2 i en vermell VP3.

Les dues poblacions de virus que es produeixen durant la infecció es diferencien pels seus coeficients de sedimentació: una població amb major coeficient i proporció que correspon a les partícules víriques nua (HAV) i una població major amb coeficient de sedimentació menor i molta proporció correspon a les partícules pseudoembolcallades (eHAV), cada una de les quals pot contenir varies càpsides (Fig. 1.2.6.2).

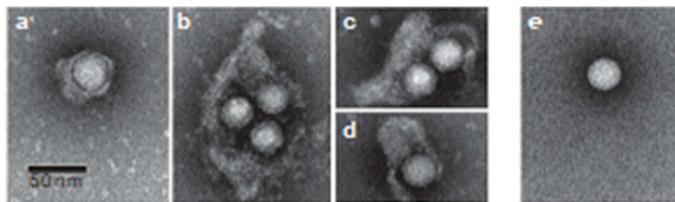


Figura 1.2.6.2. Partícules d'HAV. **a-d:** forma eHAV. **e:** forma nua HAV. Imatge adaptada de [127].

L'HAV presenta poca variació antigènica i només s'ha trobat un únic serotip i pocs llocs antigènics. Mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals i l'anàlisi de

mutants d'escapament s'han definit tres llocs antigènics discontinus. Un d'ells és l'epítop immunodominant, definit com a tal degut a que s'hi uneixen la majoria d'anticossos. Els virus que perden una part o la totalitat del reconeixement pels anticossos dirigits contra el lloc immunodominant mostren canvis en els aminoàcids Pro-65, Asp-70, Ser-71 o Gln-74 de VP3 o Ser-102, Asn-104, Lys-105 Val-171 i Ala-176 de VP1 [163][164][165]. Aquest lloc immunodominant, doncs, estaria format per diferents epítops: regió de VP1 i regió de VP3. Un altre dels epítops definits és el denominat lloc d'unió a glicoforina A identificat a partir de muntats del residu 221 de VP1, reconegut per l'anticòs H7C27 [163][164]. Tant H7C27 com un anticòs policlonal anti-VP3 (103-121) reconeixen el lloc d'unió a la glicoforina A, a través de la qual el virus pot hemaglutinar eritròcits [166]. Hi ha un tercer epítop, en que s'hi uneix l'anticòs 4E7 el qual encara no està del tot definit [164].

Tenint en compte que l'HAV replica seguint una distribució de quasiespècies [146], és probable que la manca de variabilitat antigènica sigui deguda a constriccions estructurals de la càpsida. La relació entre l'impacte de l'ús de codons en el plegament de la càpsida i aquestes constriccions estructurals pot contribuir a aquest fenotip antigènicament estable [167][160].

1.2.7. Epidemiologia de les infeccions per HAV

1.2.7.1. Vies de transmissió

La principal ruta de transmissió de l'HAV és la fecal-oral, ja sigui a través del contacte persona a persona o per la ingesta d'aigua o aliments contaminats [168]. La persistència del virus en les superfícies contaminades és molt llarga degut a la seva resistència a temperatures extremes, a pH baixos i a agents físics i químics [169][170]. En conseqüència i donada l'elevada quantitat de virus excretat en femtes (fins a 10^{11} còpies genòmiques/g de femta), la transmissió de la infecció té lloc quan no s'adopten les correctes mesures

d'higiene [6]. Un grup de risc d'adquirir infecció per HAV són els individus que duen a terme pràctiques sexuals de caràcter oral-anal, essent freqüents els brots en el col·lectiu MSM.

Els mol·luscs bivalves són el principal vehicle alimentari relacionat amb la transmissió d'aquest virus [171][172][173]. El primer brot d'hepatitis infecciosa documentat relacionat amb el consum d'aquest aliment va tenir lloc a Suècia l'any 1955, on 629 casos foren associats al consum d'ostres crues [174]. A la Comunitat Valenciana es van donar dos bots importants associats al consum de tellines contaminades importades de Perú, un al 1999 amb 189 pacients i un al 2008 amb 100 pacients [173][175].

El brot més gran que ha tingut lloc fins a data d'avui fou a Xina al 1988 on almenys 300,000 casos foren causats per la ingesta de cloïsses conreades en una zona contaminada amb aigües residuals [176].

També són freqüents brots relacionats amb altres aliments, com ara el brot recent del 2016 que va tenir lloc a 9 estats d'EEUU amb 134 persones infectades de les quals 56 hospitalitzacions a causa a unes maduixes contaminades importades d'Egipte [177]. O el gran brot del 2014 que tingué lloc 13 països de la Unió Europea/Espai Econòmic Europeu (EU/EEE) amb 1500 pacients per unes baies contaminades [178].

S'han descrit brots deguts al consum d'aigua contaminada, però en menor mesura [122]. També s'han reportat alguns casos, però amb molta menys freqüència, de transmissió parenteral a través de transfusions l'ús de drogues injectables o l'administració de productes derivats de sang [179][6].

Amb tot, no obstant, aproximadament el 40% dels casos notificats per hepatitis A la font d'infecció no pot ser identificada.

1.2.7.2. Incidència i vigilància epidemiològica

Com s'ha comentat a l'apartat 1.2.3, els genotips I, II i III són d'origen humà i el IV, V i VI contenen soques aïllades de simi. El genotip I és el més prevalent a nivell mundial, particularment el subgenotip IA que predomina al Nord, Centre i Sud-Amèrica, Xina, Japó, Tailàndia i Europa [140]. La co-circulació d'IA amb altres genotips o subgenotips es descriu a moltes regions del món. El subgenotip IB predomina més a la regió mediterrània, Sud-Àfrica i Turquia.

El subgenotip IIIA va ser aïllat inicialment a un mico mussol panameny (primat *Aotus trivirgatus*) pel que es va creure que es tractava d'una soca de simi. No obstant, estudis posteriors no trobaven els patrons de seqüència d'aminoàcids i nucleòtids que diferencien a les soques d'HAV humanes de les de simi [142]. Aquest subgenotip predomina en el continent asiàtic i poc comú a Europa i EEUU, tot i que últimament s'ha detectat un cert augment als països nòrdics europeus així com a Japó [152][153]. Hi ha estudis que suggereixen que el subgenotip IIIA és més sever, amb una clínica més greu en pacients adults en comparació amb el genotip IA [154], mentre que altres estudis no reporten diferències [155]. No obstant, a la Índia, on el genotip IIIA és el més prevalent, hi ha més casos de símptomes clínics en nens petits [180].

La co-circulació de múltiples genotips o subgenotips s'ha notificat a moltes parts del món [142]. Dels subgenotips restants, el IIA, el IIB i el IIIB són menys prevalents.

L'hepatitis A és l'hepatitis aguda més freqüent arreu del món. Per exemple, al 2010 s'estima que hi va haver al voltant de 14 milions de casos i uns 28,000 morts mundialment [8].

Només un cert percentatge (25%) del total de les infeccions simptomàtiques per hepatitis A són declarades com a tals per diverses raons, com ara que els malalts no sempre recorren a l'assistència mèdica, que els diagnòstic no és el

correcte o bé degut a que la informació no arriba a les autoritats sanitàries corresponents [181].

Els patrons de distribució de l'hepatitis A en les diferents àrees geogràfiques estan altament relacionats amb el seu desenvolupament socioeconòmic i es poden caracteritzar per tenir nivells alts, intermedis o baixos d'infecció per HAV (Fig. 1.2.7.2.1). En els països de baixos ingressos (Àfrica subsahariana i parts del continent asiàtic) amb males condicions higiènic-sanitàries, la prevalença d'anticossos anti-HAV a la població pot superar el 90% a l'edat de 10 anys. En aquestes àrees, l'exposició a l'HAV generalment té lloc abans dels 5 anys, on la infecció es desenvolupa normalment de manera asimptomàtica. Les epidèmies són doncs poc comuns ja que els adults generalment estan immunitzats i la taxa de malaltia simptomàtica en aquestes àrees és baixa i els brots són rars. En els països amb economies en transició i les regions on les condicions sanitàries són variables (algunes regions d'Àsia, Llatinoamèrica, Europa de l'Est i Orient Mitjà), els infants sovint escapen de la infecció a la infància i arriben a l'edat adulta sense immunitat. Irònicament, les millores en les condicions econòmiques i sanitàries poden portar a l'acumulació d'adults que no han estat infectats i per tant no tenen immunitat front el virus. Aquesta major susceptibilitat en els grups de major edat pot conduir a taxes de malaltia més elevades. Per això es diu que la menor prevalença d'hepatitis A es correlaciona amb una major gravetat de la malaltia.

Els països d'alts ingressos (Europa Occidental, Austràlia, Nova Zelanda, Canadà, EEUU, Japó, Corea del Sud i Singapur), amb bones condicions sanitàries i higièniques, les taxes d'infecció són força baixes però el nombre d'individus en risc d'infecció durant l'adolescència i l'edat adulta és molt elevat, i en aquests rangs d'edat la probabilitat de desenvolupar una malaltia severa simptomàtica és molt alta [5][182][183]. En aquestes regions no endèmiques, la infecció per

HAV sol ser conseqüència principalment de viatges a països d'elevada endemicitat, el consum d'aigua o aliment contaminats provinent d'aquests països o per pràctiques sexuals de risc.

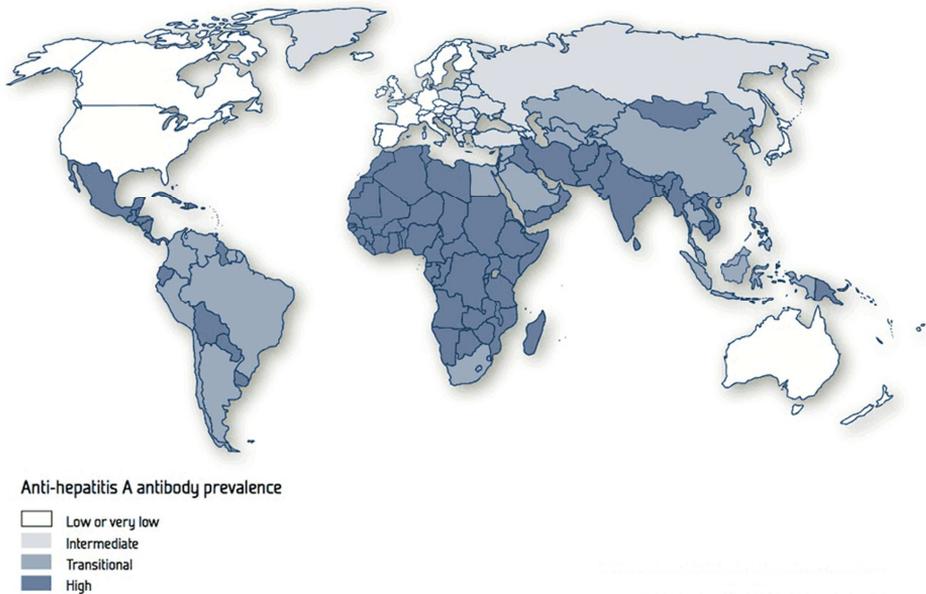


Figura 1.2.7.2.1. Nivells de prevalença d'anticossos anti-HAV a tot el món. Imatge adaptada de [184].

L'augment general dels casos/incidència de l'HAV registrats en els països de la EU/EEE des de 2011, indica un nou risc associat als moviments de població i la globalització, així com grups de població potencialment vulnerables, com ara el col·lectiu MSM. Al llarg del temps s'han anat descrivint varis brots en diferents ciutats d'Europa en el grup MSM [144][185][186] i, des de juny de 2016 existeix un important brot entre els MSM que està afectant a 22 països de la EU/EEE on s'ha notificat un total de 4,101 casos confirmats per HAV [187] i que segueix en l'actualitat, tot i que la majoria de casos foren entre el 2016-2017 (Fig. 1.2.7.2.2). Espanya és un dels països afectats amb un elevat número de casos [188], mentre que a Catalunya, gràcies a la implantació de les campanyes de

vacunació a finals del 1998 entre els preadolescents, el número de casos ha estat menor [189].

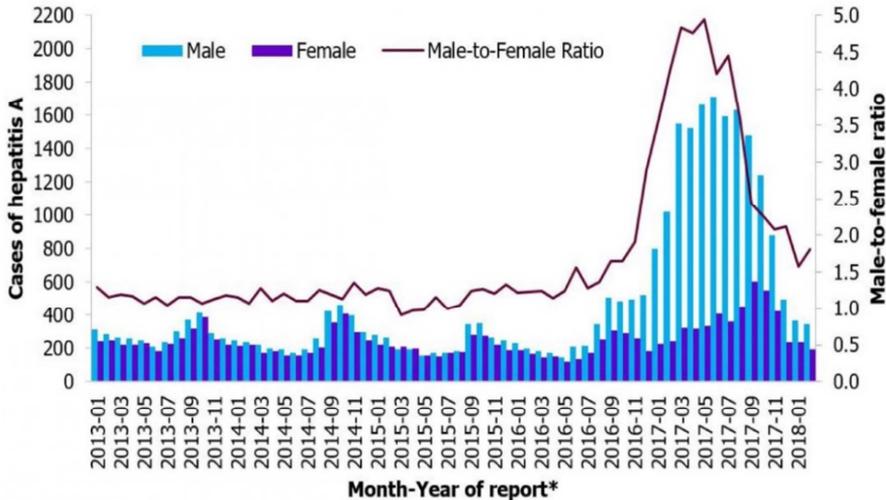


Figura 1.2.7.2.2. Brot d'hepatitis A. Distribució de casos d'hepatitis A per gènere i per la proporció home/dona, des de gener del 2013 fins a gener del 2018 a EU/EEE. On s'observa l'augment de casos des del setembre del 2016 que es correspon al brot MSM. Els països inclosos són: Àustria, Bèlgica, República Txeca, Dinamarca, Croàcia, Estònia, Finlàndia, França, Hongria, Alemanya, Grècia, Irlanda, Islàndia, Itàlia, Letònia, Lituània, Luxemburg, Malta, Holanda, Noruega, Polònia, Portugal, Eslovènia, Espanya, Suècia i el Regne Unit. Les dades de 2017-2018 del Regne Unit són només d'Anglaterra. Manquen les dades de Bèlgica del 2015 i 2016. Les dades d'Àustria, República Txeca i Luxemburg inclouen casos notificats fins al novembre de 2017 i les de Polònia només fins el desembre de 2017. Imatge extreta de [187].

Actualment també hi ha un dels brots més importants d'hepatitis A als EEUU que ha afectat a varis estats: Califòrnia, Kentucky, Michigan i Utah. S'ha vist que no hi ha una font comuna sinó que és de transmissió persona-persona entre persones sense sostre i/o que usen drogues injectables i no injectables. Ha causat una alta taxa d'hospitalització (65.4% a Califòrnia, 72.3% a Kentucky, 80.7% a Michigan i un 51.5% a Utah) i algunes morts. El brot és causat per genotip IB que normalment no es veu als EEUU i que és més comú a la regió mediterrània [190].

A l'igual que pels HuNoV, a nivell europeu existeix una xarxa de vigilància epidemiològica d'HAV anomenada HAVNet. L'objectiu d'aquesta xarxa és augmentar el coneixement sobre les infeccions per HAV i poder fer un mapa de la distribució mundial de les soques del virus de l'hepatitis A, que s'aconsegueix compartint les dades de seqüència associades amb la informació epidemiològica de diferents regions del món.

1.2.7.3. Importància sanitària i diagnòstic

L'hepatitis A és una inflamació aguda del fetge produïda com a resposta a la infecció amb l'HAV. L'espectre clínic de la infecció pot anar des d'una infecció asimptomàtica fins a una hepatitis fulminant. El virus no produeix una infecció crònica i per tant tampoc es dona una cronificació de la inflamació hepàtica. Com ja s'ha anat mencionant, en nens menors de 5 anys la infecció per HAV es desenvolupa majoritàriament de manera asimptomàtica o subclínica, mentre que en infants majors i adults generalment és simptomàtica [191]. Les manifestacions clíniques són indistingibles de la resta d'hepatitis virals i, com més gran és l'individu, amb més freqüència apareixen els símptomes. El cas clínic d'hepatitis A es defineix com a una malaltia aguda amb un inici de símptomes de caràcter inespecífic (febre, mal estar, cansament, inapetència, nàusees, vòmits, dolor abdominal, diarrea i miàlgia), icterícia i nivells elevats de bilirubina i aminotransferases. Generalment, la recuperació és completa i ofereix a l'individu immunitat de per vida front a una nova infecció. No obstant, com més gran és l'individu més severs són els símptomes i en algun cas la infecció per HAV pot derivar cap a una hepatitis fulminant causant la mort, però només en 0.5% dels casos.

En la malaltia d'hepatitis A s'hi diferencien quatre fases: incubació, prodròmica, aguda i convallescència. El període de incubació, malgrat hi hagi replicació viral, és totalment asimptomàtic podent durar de 2 a 7 setmanes. La fase prodròmica

és on apareixen els símptomes inespecífics descrits anteriorment i té una durada aproximada d'entre 5 i 7 dies abans de l'aparició de la icterícia (fase aguda). Aquests símptomes van disminuint amb l'aparició de la icterícia excepte la inapetència i el malestar [192]. La fase aguda, la icterícia, es caracteritza per una orina fosca degut a la bilirubina i esgrogueïment de la pell i les membranes mucoses, que pot durar d'entre 4 a 22 dies, durant el qual es pot detectar un increment de les transaminases en sang (500-5000 U/L) [192]. Els símptomes duren normalment menys de dos mesos, però en algun cas poden allargar-se fins a 6 mesos. El curs de la malaltia dependrà de múltiples factors com: les condicions fisiològiques pròpies de cada individu, la quantitat de progènie vírica, la quantitat d'anticossos IgA i IgG produïts com a resposta al virus i l'activitat dels limfòcits encarregats de controlar la infecció.

Es poden detectar virus en sèrum des d'abans de l'aparició dels primers símptomes fins a unes 6 setmanes després d'aquests. En femtes, la càrrega viral és més elevada, arribant a uns valors de 10^{11} còpies geòmiques/g en el moment en quan l'individu és més contagiós, l'inici dels primers símptomes. Així doncs, com en el cas dels HuNoV, el període de contagi comença abans de l'aparició dels símptomes i es manté fins a dues setmanes després [135] (Fig. 1.2.7.3.1). Malgrat la virèmia acaba poc després del desenvolupament de l'hepatitis, el virus persisteix al fetge durant mesos. L'alanina aminotransferasa (ALT), l'aspartat aminotransferasa (AST), la fosfatasa alcalina i la bilirubina total s'acostumen a trobar elevades en pacients simptomàtics, encara que tan sols l'ALT és específica per hepatitis [193].

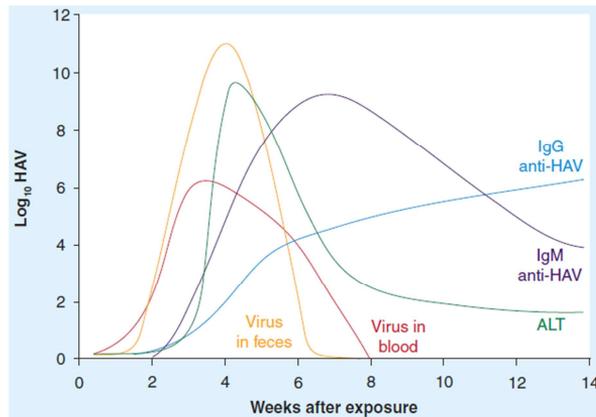


Figura 1.2.7.3.1. Evolució dels títols virals, alanina aminotransferasa (ALT) i la resposta immunològica durant la infecció per HAV. Imatge extreta de [135].

El principal mètode de diagnòstic rutinari per a la infecció per HAV usat en clínica és la determinació de IgM específica anti-HAV. Degut a que les diferents hepatitis virals són indistingibles clínicament, aquesta prova s'acompanya normalment d'una determinació d'anticossos contra els virus de l'hepatitis B i de l'hepatitis C. Altres proves diagnòstiques com els immunoassajos enzimàtics o les tècniques de RT-PCR són especialment útils per a detectar el virus en la fase d'incubació. S'han desenvolupat tècniques de RT-qPCR que permeten detectar el virus tant en mostres clíniques (femtes i sèrum) com en mostres ambientals [194]. Així doncs, les tècniques de RT-PCR i RT-qPCR són les més usades per a la detecció i caracterització molecular de l'HAV, així com per a identificar les possibles fonts d'infecció i els patrons o rutes de transmissió dels episodis epidèmics.

1.2.7.4. Control de la infecció i tractament

Per al control de la infecció primerament cal un sanejament i una higiene personal adequats per tal de prevenir la transmissió del virus per part dels individus infectats. Això adquireix especial rellevància tenint en compte que els individus infectats poden excretar el virus abans de l'aparició dels

síntomes. És fonamental doncs complir amb les correctes normes d'higiene en la manipulació d'aliments.

En segon lloc, la profilaxi pre- i post- exposició amb immunoglobulines anti-HAV que s'obtenen a partir de plasma de donants. La injecció intramuscular d'aquestes dona protecció a una elevada proporció d'individus. Una dosi de 0.02 ml/kg protegeix durant menys de 3 mesos, mentre que una dosi de 0.06 ml/kg protegeix de 3 a 5 mesos [195]. Per a la profilaxi post-exposició es solia administrar immunoglobulina durant els 14 dies posteriors a l'exposició, però la seva durada és curta i dosi-depenent. Inclús dosis elevades no protegeixen més de 4-6 mesos [192]. Actualment, per a la profilaxi es prefereix usar la vacuna, que presenta certs avantatges com la protecció a llarg termini o la major abundància de subministres.

Des de l'any 1992 existeixen varies vacunes inactivades de l'HAV, obtingudes a partir de soques de l'HAV adaptades a cultiu cel·lular, que confereixen immunitat a llarg termini. Aquesta immunització està relacionada amb la inducció d'elevats títols d'anticossos específics. Les vacunes que s'han desenvolupat cobreixen tots els genotips descrits ja que, com s'ha esmentat anteriorment, només existeix un únic serotip [135].

Existèixen diferents vacunes inactivades: AVAXIM® (Sanofi Pasteur), EPAXAL® (Crucell/Berna Biotech), HAVRIX® (GlaxoSmithKline) i VAQTA® (MerckSD) (a partir de les soques GBM, RG-SB, HM-175 i CR-326, respectivament). AVAXIM®, HAVRIX® i VAQTA® usen com a adjuvant l'alumínia, mentre que en la EPAXAL® el virus es troba absorbit a la superfície dels virosomes d'influenza reconstituïts (*Immuno Reconstitued Influenza Virosomes*, IRIVs).

També s'han desenvolupat vacunes combinades: la Twinrix® (GlaxoSmithKline), basada en la soca HM-175 de l'HAV i l'antigen de superfície del virus de la hepatitis B (HBsAg), que serveix per prevenir les hepatitis A i B [196], i Vivaxim®

(Sanofi Pasteur) que protegeix contra l'hepatitis A i la febre tifoide i es basa en la soca GBM de l'HAV i el polisacàrid capsular Vi-AG de *Salmonella typhi* [197].

Aquestes vacunes presenten una elevada eficàcia protectora, però són necessàries dues dosis per a una completa protecció i la seva producció té un cost molt elevat.

També existeixen vacunes atenuada basades en les soques H2 o LA-1, amb alta immunogenicitat, eficàcia i duració de la protecció que es fabriquen i utilitzen principalment a la Xina [198][199]. Una de les avantatges de les atenuades respecte les inactivades és que són més barates. El principal desavantatge és la possible reversió de les mutacions associades a l'atenuació en les soques vacunals vives.

Totes són molt efectives, no obstant, s'han descrit alguns casos on la vacuna no ha funcionat, i la seva explicació és difícil [200][201][202]. En el nostre grup també s'han detectat casos on la vacuna no ha funcionat [203], en molts d'ells per haver rebut solament una dosi.

Aproximadament la meitat de les infeccions per hepatitis A tenen lloc en pacients que no presenten factors de risc, pel que vacunar solament als grups d'alt risc no sembla ser una bona estratègia per a reduir la incidència de la malaltia [204]. Els infants tenen les majors taxes d'infecció i són el reservori del virus més important dins de la comunitat. De fet, la majoria de brots de l'hepatitis A tenen lloc en infants, adolescents i adults joves que viuen en comunitats d'endemicitat intermèdia i aquets brots tendeixen a estendre's a altres comunitats [204]. Per això, vacunant als infants de forma rutinària a més de protegir-los per futures infeccions s'elimina una de les fonts principals d'infecció en adults que, com s'ha comentat anteriorment, tenen unes conseqüències clíniques més greus.

S'ha comprovat que les campanyes de vacunació infantil en diferents països i regions han tingut èxit, amb unes bones taxes de cobertura i disminucions de la

incidència de fins a un 90% [181]. Països o regions on s'ha implementat la vacunació universal com ara Catalunya (Espanya), Puglia (Itàlia), Israel i varis estats dels EEUU, han demostrat un impacte exitós en la incidència d'hepatitis A [181]. A Catalunya, per exemple, des de la implementació de la campanya vacunal en els infants al finals del 1998 hi ha hagut una reducció de 6.2 casos per 100,000 habitants del 1996-1998 a 2.6 al 1999-2001 [205] i menys de 1.5 casos per 100,000 habitants en el període 2010-2013 [180].

La OMS recomana que es vacunin els individus amb un risc elevat de contraure la infecció per l'HAV en àrees de baixa endemicitat, així com realitzar campanyes de vacunació infantil massiva en països d'endemicitat intermèdia. Entre els grups de risc de contraure la infecció hi trobem: les persones que viatgen a països en els quals el virus és endèmic, els consumidors de drogues, les persones que mantenen pràctiques sexuals oro-anals i les que pateixen una hepatopatia crònica pel risc de complicacions greus en cas d'infecció per HAV [206]. També es recomana la vacunació al personal que treballa en llars d'infants de 0 a 3 anys, treballadors en contacte amb aigües residuals no depurades, personal sanitari i manipuladors d'aliments, entre d'altres.

Ens els casos d'infecció per l'HAV, no hi ha cap tractament específic i la teràpia que s'aplica està dirigida a mantenir un correcte benestar del pacient i l'equilibri nutricional, inclosa la rehidratació provocada pels vòmits i diarrees. La hospitalització no és normalment requerida excepte en casos molt aguts o en hepatitis fulminants.

La implementació de programes de seguretat d'aliments, especialment en el cas dels mol·lusc bivalves representa una important acció de prevenció i control de la infecció per HAV. Així doncs, la millora del sanejament, la innocuïtat dels aliments i la vacunació són les mesures més eficaces per a combatre l'hepatitis A.

2. NOUS MÈTODES MOLECULARS

Els mètodes més usats en l'estudi epidemiològic molecular dels brots per virus estan basats en la PCR. Amb la PCR es detecta la presència de genomes vírics, normalment de regions conservades, i en cas que sigui necessari es realitza Nested-PCR per tal d'augmentar la sensibilitat de la detecció. La tècnica de PCR quantitativa permet detectar i quantificar els genomes vírics de la mostra de forma molt fiable. No obstant, la majoria de mètodes moleculars emprats tenen la limitació de que no permeten distingir si els virus detectats són infecciosos o no.

Per al tipatge dels virus, la tècnica de seqüenciació més usada és la creada per Sanger *et al.* [207], però la seqüenciació ha patit una frapant revolució en la darrera dècada. Tot i els costos elevats de les tècniques de NGS les innovacions en el camp de la seqüenciació han evolucionat molt ràpidament, permetent reduir cada vegada més la despesa econòmica. La informació que es genera n'és molta i l'anàlisi laboriós.

Les tècniques de NGS són un enfoc molt atractiu per l'estudi de la metagenòmica (estudi de tot el material genètic que hi ha en una mostra) gràcies a la seva independència de la necessitat de la informació prèvia [208]. Una altra aplicació comú de NGS és la reconstrucció de genomes virals per a obtenir la seqüència completa del virus [209]. S'han publicat també estudis on mitjançant NGS aconseguïen la cobertura completa del genoma de HuNoV [210][211].

Un altre gran avantatge i utilitat que tenen és que són molt útils per a l'estudi de poblacions virals permetent detectar genomes minoritaris que comprenen tant sols un 1% de la població. Això permet l'estudi de poblacions virals a uns nivells de detall sense precedents, podent detectar mutacions de baixa freqüència i donar una visió de la diversitat genètica de la població viral d'una mostra [212]. Amb la NGS es pot veure la diversitat viral dins d'un individu

[213] o confirmar la transmissió del virus entre diferents individus [211]. L'ús de NGS de manera rutinària de mostres clíniques pot ser una bona eina per a detectar patògens potencials que no estarien coberts per diagnòstics més generals. Si un pacient en tractament amb una població mixta té una variant minoritària resistent al fàrmac, aquesta pot reemplaçar la variant majoritària. Amb la NGS es poden detectar aquestes variants minoritàries i es pot veure quin és el tractament més adequat per a cada pacient gràcies a una bona i precisa subtificació [214][215][216]. Les diverses i múltiples plataformes de NGS per a estudiar les quasiespècies víriques, ofereixen una lupa per estudiar la seva complexitat.

La NGS doncs té un paper cada cop més important en l'anàlisi de poblacions de virus per a estudis d'evolució viral, d'epidemiologia i de teràpia viral, entre altres.

En aquesta tesi s'ha usat dues plataformes diferents, la 454/GS-Junior de Roche per a l'estudi de NoV i la plataforma MiSeq d'Illumina per a l'estudi d'HAV.

2.1. Seqüenciació de segona generació

El principi de realitzar un gran número de reaccions de seqüenciació paral·leles és el que va definir la seqüenciació de segona generació [217].

Les plataformes de NGS són múltiples i variades, i malgrat les diferències entre elles en les tècniques de preparació del DNA a seqüenciar (llibreries) i el mètode que es fa servir per seqüenciar, totes elles impliquen els mateixos passos.

Segons la tècnica de preparació de la llibreria hi ha: PCR en emulsió (emPCR), que serien les plataformes SOLID, Ion Torrent i 454 de Roche, o mitjançant una PCR pont, que és propi d'Illumina.

Degut a que en aquesta tesi s'ha usat la 454/GS-Junior i la MiSeq, s'explicaran aquestes dues breument.

2.1.1. 454/GS-Junior (Roche)

La plataforma 454 de Roche fou la primera plataforma de NGS en comercialitzar-se (a l'any 2004), usant la tècnica de seqüenciació coneguda com a piroseqüenciació. La preparació de la llibreria es pot fer mitjançant qualsevol mètode que doni lloc a una barreja de fragments flanquejats per dos adaptadors (A i B). En aquesta tesi doctoral, per la preparació de la llibreria s'ha utilitzat una Nested-PCR amb uns encebadors universals M13 més l'identificador (*Multiplex Identifier*, MID) on cada pacient rep un MID diferent per a la seva posterior identificació, més l'adaptador A o B (que inclou quatre nucleòtids anomenats *key*). (Fig. 2.1.1.1) [216].



Figura 2.1.1.1. Esquema de l'amplicó final, previ a la seqüenciació.

Per a una bona unió dels adaptadors a les microesferes, l'adaptador B està marcat amb biotina, de manera que els productes que s'hagin format amb els adaptadors AB, BA i BB s'uniran a les boles que porten estreptavidina, i els productes amb els dos adaptadors AA seran rentats i eliminats. En el cas dels fragments amb dos adaptadors B, quedaran ambdós enganxats a les microesferes i no es llegiran. Així doncs, només es construirà la llibreria amb els fragments units als adaptadors A i B.

Un cop llest tindrà lloc l'emPCR, pas en el que es crea un emulsió d'aigua-oli per encapsular complexos entre el DNA (amb els adaptadors) i les nanosferes que estan recobertes amb els adaptadors. A cada bola hi haurà doncs una molècula de DNA i una nanosfera, anomenant-se microreactors. A cada microreactor té lloc l'amplificació, de tal manera que cada nanosfera queda recoberta per varis milers de còpies de la molècula de DNA inicial. Aquests microreactors seran

posteriorment dipositats en un suport sòlid amb micropous on només hi podrà entrar un de sol. Aquí dins tindrà lloc la seqüenciació basada en la piroseqüenciació, seqüenciació que es basa en la detecció quimioluminiscent del pirofosfat alliberat durant l'elongació de la cadena complementària de DNA (Fig. 2.1.1.2).

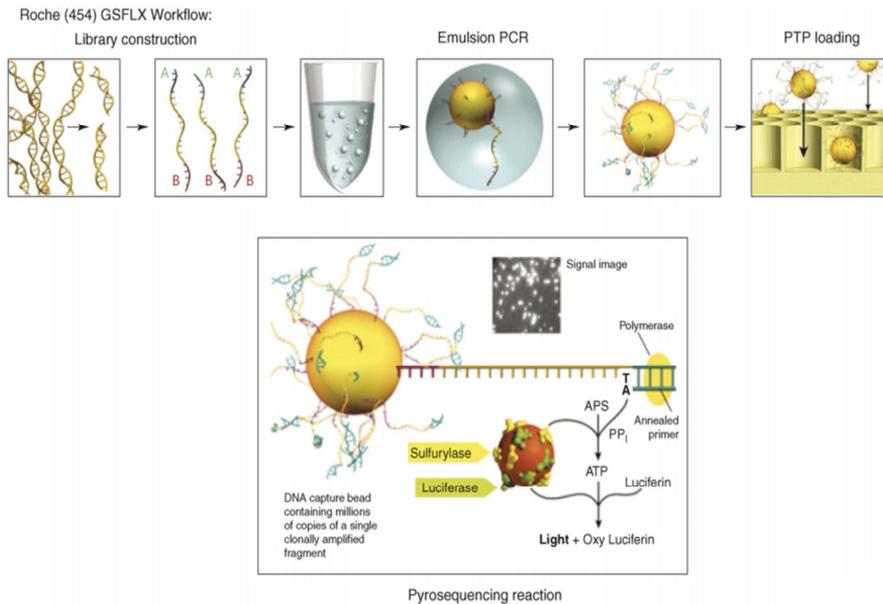


Figura 2.1.1.2. Esquema del funcionament de 454 de Roche. Preparació de la llibreria; emulsió oli-aigua per a generar microreactors: complexos de DNA i nanosferes, on tindrà lloc l'emPCR de tal manera que cada nanosfera quedi recoberta per varis milers de còpies de la mateixa seqüència motlle. Les nanosferes es dipositen en els pouets de la placa on té lloc la piroseqüenciació. Imatge extreta de [218].

2.1.2. Illumina Sequencing

Illumina és la tecnologia de seqüenciació més usada avui en dia. Es va introduir a l'any 2006 (primer Solexa que fou adquirida per Illumina) i es basa en el concepte de "seqüenciació per síntesi" (SBS). Illumina disposa de diverses plataformes de seqüenciació: MiniSeq, MiSeq, NextSeq i HiSeq, per adaptar-se a l'experiment de cadascú. En aquesta tesi s'ha usat la plataforma MiSeq.

Per a la construcció de la llibreria, un cop obtingut el DNA a analitzar es generen extrems roms on s'hi afegeix una base "A" que servirà per a lligar els adaptadors (P5 i P7) ja que tenen "T". L'adaptador té una seqüència, l'índex, per a la identificació de cada mostra (Fig 2.1.2.1).



Figura 2.1.2.1. Esquema de l'amplicó final, previ a al realització de la seqüenciació.

Un cop la llibreria està preparada, es carrega a una superfície sòlida, la *flow cell* on hi ha ancorats encebadors complementaris als adaptadors. Hibridaran i s'iniciarà la copia de la cadena per l'extrem 3'. Un cop finalitzat es desnaturalitzarà el DNA, i es farà un rentat fent que només es quedi la copia que està fixada a la *flow cell*. Aquesta cadena simple es doblegarà i l'extrem 5' hibridarà amb l'adaptador complementari, iniciant-se altre cop l'extensió de la cadena complementària de la nostra llibreria. Un cop feta, es desnaturalitzaran les dobles cadenes obtenint-se dues còpies de cadena simple complementàries unides pels adaptadors a la *flow cell*, i es tornarà a repetir el mateix procediment formant-se els clústers clonals del fragment original. Aquest procés s'anomena amplificació per pont (*bridge PCR*) i té lloc a milers de clústers de tota la *flow cell* a la vegada (Fig. 2.1.2.2).

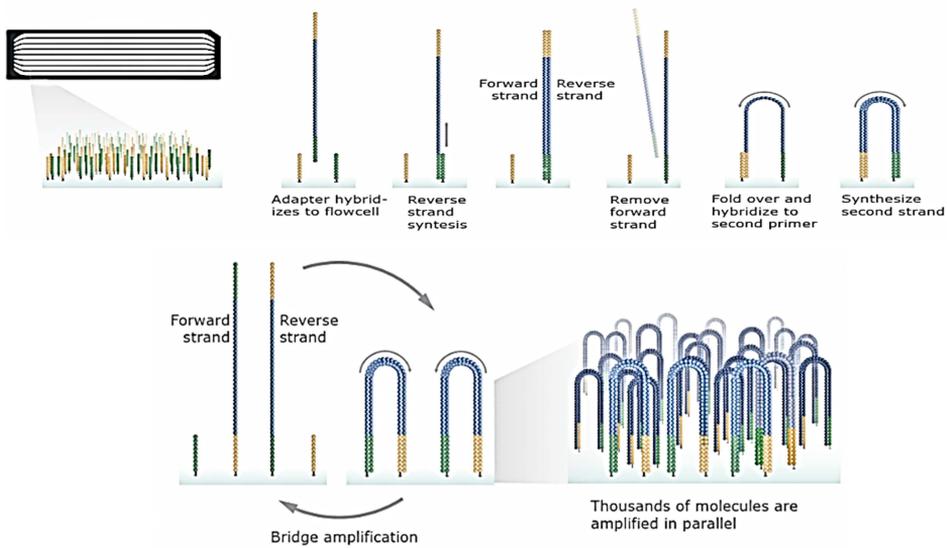


Figura 2.1.2.2. Esquema del procés de formació de clústers clonals mitjançant amplificació per PCR pont. Imatge extreta i adaptada de: <https://www.illumina.com>.

Un cop feta les PCRs ponts s'iniciarà la seqüenciació. Es desnaturalitzaran les doble cadenes i mitjançant un rentat les còpies *reverse* s'eliminaran, quedant-se només les cadenes *forward*. Per evitar unions inespecífiques al llarg del procés de seqüenciació, es bloquejaran els extrems 3' de les cadenes i dels adaptadors que hagin quedat lliures a la base de la *flow cell*. S'unirà l'encebador de seqüenciació a l'extrem 3' i s'iniciarà el primer cicle de seqüenciació.

Es seqüencia usant els quatre nucleòtids terminadors marcats cada un amb un fluoròfor diferent, que s'alliberarà quan s'uneix al DNA produint un feix de llum específic de tal manera que el seqüenciador podrà detectar el nucleòtid corresponent. Això tindrà lloc a tots els clústers a la vegada. Un cop llegida la cadena *forward*, la cadena generada durant la seqüenciació es desnaturalitza i s'elimina amb un rentat, deixant el DNA original, i es desbloquegen els extrems 3' del DNA i dels adaptadors de la *flow cell*. La molècula de cadena senzilla es plegarà de nou fins que l'extrem 3' hibridi amb l'adaptador que ha quedat lliure

i es sintetitzarà la cadena *reverse*. Un cop feta, es desnaturalitzarà i mitjançant un rentat la cadena *forward* (que ja s'ha seqüenciat) serà eliminada. De la mateixa manera que s'ha fet amb els extrems a la primera fase de la seqüenciació, es tornen a bloquejar per evitar unions inespecífiques. Hibridarà el primer de seqüenciació a l'extrem i s'iniciarà la segona ronda de seqüenciació per obtenir la seqüència complementaria a l'obtinguda a la primera fase. El resultat final doncs s'obté a través d'una seqüència de base per base (Fig. 2.1.2.3).

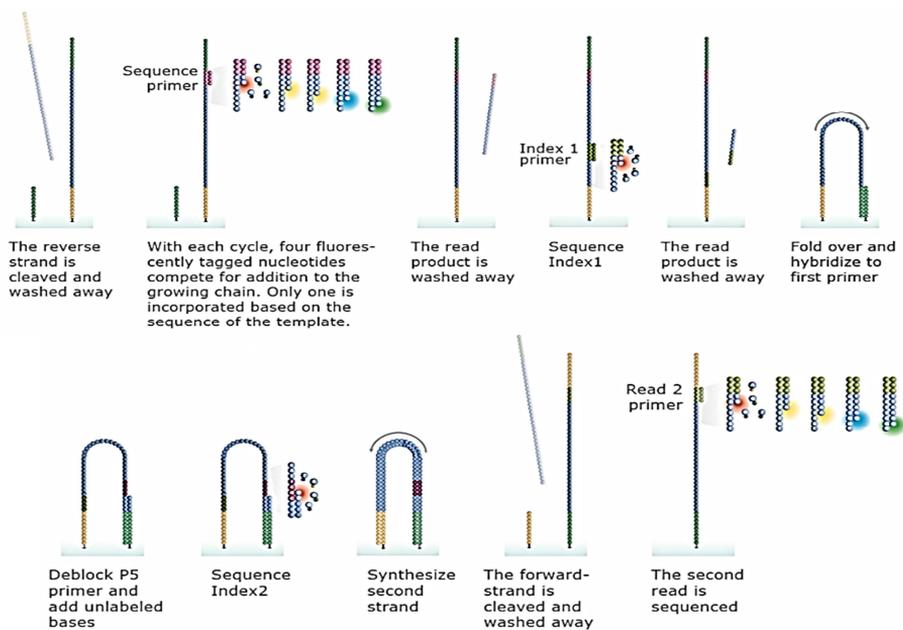


Figura 2.1.2.3. Esquema del procés de seqüenciació de la plataforma MiSeq d'Illumina. Imatge adaptada extreta i adaptada de: <https://www.illumina.com>.

2.2. Seqüenciació de tercera generació

Les tècniques de segona generació tenen una limitació important i és la curta longitud de les seqüències de lectura que restringeixen la capacitat de seqüenciar genomes complets. La tecnologia de seqüenciació de tercera

generació en canvi permet generar lectures molt més llargues, de mitjana de 6.000-8.000 pb, amb un màxim de 30-150 kpb [219].

Amb aquesta seqüenciació no s'inclou el pas previ d'amplificació per PCR, permetent la seqüenciació d'una sola molècula. La tecnologia més establerta és la seqüenciació de molècula única en temps real (*Single Molecule Real-Time*, SMRT) de Pacific Biosciences (PacBio), però n'hi ha d'altres com la plataforma de seqüenciació Oxford Nanopore.

La seqüenciació SMRT de la plataforma PacBio es va introduir comercialment al 2010 i permet seqüenciar una única molècula a temps real, analitzant cadenes de 30,000 pb (mitjana de >15,000 pb, algunes lectures de >100,000 pb). Es crea una molècula de DNA circular tancada mitjançant la unió d'adaptadors en ambdós extrems de la molècula, que s'anomena al conjunt *SMRTbell*. El disseny es basa en una cel·la (*SMRTcells*) que conte milers de nanopous denominats *zero-mode waveguide* (ZMW) on a la base de cada ZMW hi ha un orifici per on és possible el pas de la llum i una polimerasa fixada, on hi anirà a parar una molècula de DNA que hi quedarà immobilitzada (Fig. 2.2.1.A). Per a l'amplificació s'usen nucleòtids amb bases nitrogenades marcades amb una molècula fluorescent, diferent per a cada un, que permetrà la seva identificació durant la síntesi. La molècula fluorescent s'uneix al grup fosfat del nucleòtid i quan aquest s'incorpora a la cadena de DNA s'allibera el complex fluoròfor-fosfat que és excitat per un feix de llum i detectat (Fig. 2.2.1.B). Com la *SMRTbell* forma un cercle tancat, després de que la polimerasa hagi replicat una cadena, pot continuar incorporant les bases de l'adaptador i després l'altre cadena. Ambdues cadenes es seqüenciaran moltes vegades.

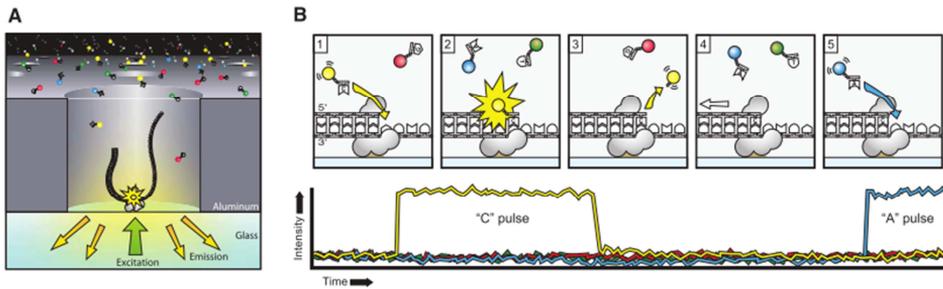


Figura 2.2.1. Esquema del funcionament de PacBio. **A:** SMRTbell en una ZMW, on l'adaptador s'uneix a la polimerasa immobilitzada a la part inferior. **B:** Per a cada nucleòtid hi ha una molècula fluorescent (unida a la cadena del fosfat) amb diferent espectre d'emissió per a que el detector pugui identificar la base que està sent incorporada a mesura que la polimerasa realitza la síntesi. El temps en que un nucleòtid marcat resideix al lloc actiu és de milisegons i es correspon en un pols de fluorescència que és registrat. El producte alliberat es difumina ràpidament, disminuint la senyal de fluorescència. Imatge extreta de [220].

OBJECTIUS

Aquesta Tesi Doctoral té l'objectiu d'aprofundir en l'epidemiologia i la caracterització molecular de brots causats per HuNoV i per HAV mitjançant l'anàlisi de les seqüències consens a través de Sanger, i l'anàlisi de la població vírica mitjançant NSG.

Els objectius específics proposats s'agrupen en quatre blocs:

1. Anàlisi de l'epidemiologia molecular de HuNoV per conèixer els genotips més freqüents causants de brots de gastroenteritis i l'emergència de noves variants a la població de Catalunya.
2. Estudi de la incidència i característiques de les infeccions per HuNoV en els manipuladors d'aliments i/o treballadors d'institucions sanitàries que han estat exposats al virus en situacions de brots.
3. Estudi de la variabilitat genètica de quasiespècies circulants en brots de HuNoV mitjançant l'anàlisi NGS del domini variable de la càpsida, i de l'evolució d'aquestes quasiespècies dins l'hoste durant una infecció aguda.
4. Caracterització de les quasiespècies circulants en brots d'HAV mitjançant el desenvolupament d'un protocol de NGS que permeti l'anàlisi de la totalitat de la càpsida vírica.

INFORME DELS ARTICLES

1. Informe dels articles publicats i dels seus factors d'impacte

Els articles que formen part de la memòria de la Tesi Doctoral presentada per Aurora Sabrià Sunyé han estat publicats o s'han sotmès en revistes internacionals en el camp de la Virologia indexades en el *Journal Citation Reports*.

Article I:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, Martínez A, de Simón M, Domínguez A, Guix S, Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. **“Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant”** J Clin Virol. 2014;60(2):96-104. doi:10.1016/j.jcv.2014.03.013. S'ha publicat a la revista *Journal of Clinical Virology* a l'any 2014.

Article II:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, Martínez A, Simón M, Domínguez A, Guix S. **“Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings”** J Clin Virol. 2016;82:119-125. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.012. S'ha publicat a la revista *Journal of Clinical Virology* a l'any 2016.

La revista ***Journal of Clinical Virology*** es troba en el segon quartil de l'àrea de Virologia, amb un factor d'impacte de 3.051 a l'any 2016.

Article III:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Quer J, Garcia-Cehic D, Gregori J, Dominguez A, Carol M, Sala-Farré RM, Guix S. **“Characterization of intra- and inter-host**

norovirus P2 genetic variability in linked individuals by amplicon sequencing”

S’ha sotmès a la revista PLoS One a l’any 2018 i es troba actualment en revisió.

La revista **PLoS One** es troba en el primer quartil de l’àrea de Ciències Multidisciplinars, amb un factor d’impacte de 2.806 a l’any 2016.

Article IV:

Sabrià A, Gregori J, Quer J, Garcia-Cehic D, Guix S, Manzanares S, Caylà J, Bosch A, Pintó RM “**Deep-sequencing characterization of an outbreak of hepatitis A in the men-having-sex-with men group: evidence for positive selection of antigenic variants**” S’ha sotmès a la revista *Lancet Infectious Diseases* a l’any 2018.

La revista **Lancet Infectious Diseases** es troba en el primer quartil de l’àrea de Malalties Infeccioses, amb un factor d’impacte de 19.864 a l’any 2016.

Directora i tutora

Directora

Dra. Susana Guix Arnau

Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Barcelona, juny del 2018

2. Informe de coautoria dels articles publicats

Article I:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, Martínez A, de Simón M, Domínguez A, Guix S, Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. **“Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant”** J Clin Virol. 2014 Jun;60(2):96-104. doi:10.1016/j.jcv.2014.03.013.

Article II:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, Martínez A, Simón M, Domínguez A, Guix S. **“Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings”** J Clin Virol. 2016 Sep;82:119-125. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.012.

Article III:

Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Quer J, Garcia-Cehic D, Gregori J, Dominguez A, Carol M, Sala-Farré RM, Guix S. **“Characterization of intra- and inter-host norovirus P2 genetic variability in linked individuals by amplicon sequencing”** PLoS One. Manuscrit en revisió.

Els articles I, II i III s’han dut a terme en el marc del projecte PS09/02516, finançat pel Fondo de Investigaciones Sanitarias Instituto de Salud Carlos III.

La doctoranda ha dut a terme tota la part experimental dels treballs i la gestió de les bases de dades epidemiològiques, així com l’anàlisi i interpretació dels resultats, a excepció, en l’article III, de la preparació de la llibreria per a la seqüenciació NGS i la generació de les dades bioinformàtiques. Ha participat de forma activa en la redacció dels manuscrits I i II, i ha elaborat el manuscrit III

amb ajuda de la resta de co-autors i sota la supervisió de les directores de tesi. Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Article IV:

Sabrià A, Gregori J, Quer J, Garcia-Cehic D, Guix S, Manzanares S, Caylà J, Bosch A, Pintó RM. “**Deep-sequencing characterization of an outbreak of hepatitis A in the men-having-sex-with men group: evidence for positive selection of antigenic variants**” Manuscrit sotmès al 2018.

L'article IV s'ha dut a terme en el marc dels projectes BIO2014-53285 i BIO2017-83191-R, finançats pel Ministerio de Economía y Competitividad.

La doctoranda ha dut a terme la part experimental del treball i la gestió de les dades, a excepció de la generació de les dades bioinformàtiques. Ha participat en l'anàlisi, interpretació dels resultats i en la redacció de manuscrit. Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Directora i tutora

Directora

Dra. Susana Guix Arnau

Dra. Rosa Maria Pintó Solé

Barcelona, juny del 2018

PUBLICACIONES

Article I: Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant

Autors: Aurora Sabrià, Rosa M. Pintó, Albert Bosch, Rosa Bartolomé, Thais Cornejo, Núria Torner, Ana Martínez, Mercedes de Simón, Angela Domínguez, Susana Guix, the Catalan Viral Gastroenteritis Study Group.

Els norovirus humans (HuNoV) són la causa principal de gastroenteritis agudes no bacterianes arreu del món. Es transmeten via fecal-oral i són la principal causa de brots transmesos a través d'aliments contaminats. El genotip predominant és el GII.4, que varia cada 2-3 anys degut a l'emergència de noves variants que reemplacen les variants anteriors.

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar la prevalença i diversitat genètica dels HuNoV causants de brots de gastroenteritis aguda (GEA) a Catalunya durant un període de tres anys (2010-2012), amb una atenció especial a la nova variant apareguda, la GII.4 Sydney 2012. També es va determinar si entre les diferents variants GII.4 circulants en la població hi havia diferències en les càrregues virals excretades pels individus infectats, cosa que podria explicar parcialment que alguna de les variants tingués una major capacitat de transmissibilitat entre individus i això afavorís la seva emergència.

En els tres anys d'estudi es van notificar un total de 169 brots amb sospita d'origen víric, on s'hi havien descartat bacteris, toxines, paràsits, rotavirus i adenovirus. Es va fer l'extracció de l'RNA viral, l'amplificació de la regió d'unió ORF1/ORF2 i la seqüenciació per Sanger d'algunes mostres de cada brot, usant l'algoritme NoroNet per a la tipificació. Es seleccionaren mostres de diferents variants de GII.4 per a seqüenciar una regió major de la regió més variable de la càpsida vírica i es va dur a terme la determinació de la càrrega viral per RT-qPCR d'un sol pas.

Es va identificar els HuNoV com a únic agent causant de GEA en 128 brots. La via de transmissió majoritària fou l'alimentària (51.6%), on el marisc

contaminat fou responsable de la majoria de brots. Dels que s'obtingué la informació de genogrup i tipus de transmissió 45.1% van ser brots causats per GII d'origen alimentari, 36.1% van ser causats per GII amb transmissió persona-persona, 5.7% van ser brots causats per GI de transmissió persona-persona, 4.9% van ser brots causats per GI+GII de transmissió alimentària, 2.5% van ser brots causats per GI+GII de transmissió persona-persona, 2.5% van ser brots d'origen hídric causats per GII, 1.6% van ser brots d'origen alimentari causats per GI, 0.8% van ser brots d'origen hídric causats per GI i 0.8% van ser brots d'origen hídric causats per GI+GII. A nivell de genotip es van detectar 12 GII i 3 GI diferents, essent el GII.4 el predominant, que es va detectar a més, en combinació amb altres genotips. Els genotips (no GII.4) amb prevalences majors al 5% foren el GII.6 i el GII.1.

Només quatre genotips, el GII.1, GII.4, GII.6 i GII.7, foren detectats durant els tres anys d'estudi i el GII.4 fou detectat amb major freqüència als mesos freds. Als mesos càlids dels anys 2011 i 2012 es va observar un augment dels brots causats per genotips diferents al GII.4.

Mirant en funció de l'edat dels individus, es va observar una major diversitat de genotips en menors de 15 anys que va anar disminuint amb l'edat, essent només el GII.4 i el GII.6 els únics aïllats en tots els rang d'edats.

Tal com s'havia vist en altres indrets, a l'any 2012 es va observar una clara substitució de la soca GII.4 New Orleans 2009 per la nova soca GII.4 Sidney 2012, remarcant que en un brot interpersonal al febrer del 2011 a Catalunya ja es va detectar la variant Sidney 2012. Es va analitzar una regió més gran que incloïa part del domini P2 d'aquells brots de GII.4 que no van poder ser tipats a nivell de variant, el brot de la primera variant 2012 aïllada i quatre escollits a l'atzar. Es van detectar canvis d'aminoàcid prèviament descrits tant al domini P2 com al domini S, i una mutació no descrita al residu 8 (A/V). Tot i que no es va trobar diferències significatives en els nivells d'excreció entre les dues

variants, la 2012 va reemplaçar clarament al final de l'estudi la soca predominant anterior.

Els resultats obtinguts en aquest estudi demostren que cal seguir amb la vigilància de les soques que circulen a la regió, veure com evolucionen i on tenen lloc els brots.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

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

Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant



Aurora Sabrià^{a,b}, Rosa M. Pintó^{a,b}, Albert Bosch^{a,b}, Rosa Bartolomé^c, Thais Cornejo^c, Núria Torner^{d,e}, Ana Martínez^d, Mercedes de Simón^f, Angela Domínguez^{e,g}, Susana Guix^{a,b,*}, the Catalan Viral Gastroenteritis Study Group

^a Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), University of Barcelona, Avda Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramanet, Spain

^c Laboratory of Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Psg Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain

^d Department of Health, Generalitat of Catalonia, Roc Boronat 81–95, 08005 Barcelona, Spain

^e CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain

^f Laboratory of the Public Health Agency, Pl. Lesseps 1, 08024 Barcelona, Spain

^g Department of Public Health, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 27 February 2014

Accepted 19 March 2014

Keywords:

Human norovirus

Molecular epidemiology

Gastroenteritis outbreak

Viral load

Genetic variation

ABSTRACT

Background: Norovirus (NoV) is the most common cause of acute nonbacterial gastroenteritis outbreaks worldwide, but the impact of NoV infections in Spain remains underestimated.

Objectives: This study aimed to determine the prevalence and genetic diversity of NoVs causing outbreaks of acute gastroenteritis in Northeastern Spain (Catalonia) during 2010–2012, and to compare clinical features and levels of viral shedding of the most prevalent GII.4 2012 variant with its predecessor.

Study design: NoVs were screened and genotyped in stools from gastroenteritis outbreaks. Genetic diversity over a region covering 50% of VP1, and viral loads were analyzed in stools belonging to GII.4 2009 and 2012 variants.

Results: More than 50% of outbreaks were caused by genotype GII.4, although outbreaks caused by multiple strains, GII.6 and GII.1 were also prevalent. During 2012, GII.4 2012 strains clearly replaced GII.4 2009 strains. The first 2012 strain was detected in February 2011, representing the earliest isolate reported worldwide. Epidemiological features of GII.4 2012 and GII.4 2009 outbreaks were comparable, as well as levels of viral shedding in stools. Finally, analysis of the capsid gene showed a higher amino acid variability and diversification in GII.4 2012, affecting sites located at the P2 domain, but also in the shell domain.

Conclusions: Clinical features of outbreaks caused by different genotypes circulating in Spain, including outbreaks caused by GII.4 2012 and GII.4 2009 strains, were comparable. Although shed at similar levels than GII.4 2009 strains, GII.4 2012 strains have clearly replaced the previous predominant strain.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Noroviruses (NoVs) are the leading cause of acute non-bacterial gastroenteritis as well as the principal cause of foodborne disease

Abbreviations: NoV, norovirus; GI, genogroup I; GII, genogroup II; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; ORF, open reading frame.

* Corresponding author at: Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 934039770; fax: +34 934034629.

E-mail address: susanaguix@ub.edu (S. Guix).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.013>

1386-6532/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

worldwide, infecting all age groups [1,2]. Although NoVs can cause sporadic cases of viral gastroenteritis, they are highly infectious and cause large gastroenteritis outbreaks [3]. NoVs are a genetically and antigenically diverse genus in the *Caliciviridae* family. They are non-enveloped icosahedral small viruses with a 7.5–7.7 kb positive-sense single-stranded RNA genome. NoVs are divided into five genogroups and further classified into a total of at least 30 genotypes [4,5]. During the last decade strains belonging to genogroup II, genotype 4 (GII.4) have been primarily responsible for the majority of the cases and outbreaks throughout the world. Although the reason(s) that would explain why GII.4 strains evolve faster and spread more rapidly throughout the globe have not been fully elucidated [6], it is clear that pandemic GII.4 variants have successively

emerged and circulated across all continents [7–9]. Since late 2012, the GII.4 variant named Sydney 2012 has progressively replaced the predecessor GII.4 New Orleans 2009 variant globally [10,13].

Studies on the role of NoV in non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Spain indicate increasing prevalences between 2000 and 2006 [14–17]. However, diagnostics of NoV infections is still not performed systematically, and NoV clinical importance in the country remains underestimated. Although strain diversity in the country has been analyzed recently at the environmental level [18], and in mussel samples [19], information on the strains responsible for clinical disease in the population has not been updated since 2006 [15].

2. Objectives

The aim of this study was to determine the prevalence and genetic diversity of NoVs causing outbreaks of acute gastroenteritis in Catalonia, Spain, during 2010–2012, and the especial influence of the recent GII.4 2012 variant and other prevalent genotypes on outbreak dynamics in this territory, which is located in northeastern Spain and has 7.5 million inhabitants. In addition, viral loads in feces from different GII.4 variants were compared to assess whether differences in excretion levels could contribute to explain the higher prevalence of selected new strains over the older ones.

3. Study design

3.1. Epidemiological data, outbreaks, and specimen collection

Outbreaks of acute gastroenteritis were reported to the Public Health Agency of Catalonia. Epidemiological data and 815 stool samples were collected from 169 reported outbreaks with suspected viral origin from January 2010 to December 2012. Stool samples were pre-screened in two laboratories covering different geographic areas (the Laboratory of Microbiology of the Hospital Universitari Vall d'Hebron [HUVH], or the Public Health Agency of Barcelona [ASPB] Laboratory) using standard microbiological tests to rule out bacteria, toxins and parasites. Specimens underwent molecular testing for rotavirus, astrovirus and enteric adenovirus.

3.2. NoV GI and GII screening by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and amplification by semi-nested RT-PCR

Stool samples from outbreaks which were negative for all the above mentioned pathogens were screened for NoV by two different one-step qRT-PCR assays, depending on the laboratory of analysis. Viral RNA was extracted from a 10% stool suspension in phosphate-buffered saline (pH 7.4) and was stored at -80°C . Samples analyzed at HUVH were extracted using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany) and analyzed by a duplex qRT-PCR assay based on primers and probes described by Kageyama et al. [20]. At the ASPB, samples were extracted using the NucliSENS Lysis Buffer and Magnetic Extraction Reagents and the MiniMag procedure (BioMérieux, France), and analyzed using the MutaREAL Norovirus Real Time RT-PCR Kit (Immundiagnostik, Germany). Semi-nested RT-PCR targeting the ORF1/ORF2 junction region (region C) for amplification and sequencing of 2–3 randomly selected positive samples from each outbreak was performed as previously described [18].

3.3. Sequencing, phylogenetic analysis, and genotype assignment

PCR products were purified and sequenced with the ABI PRISM BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.1 on an ABI Prism 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis was performed using the neighbor-joining method (distance calculation by the Kimura-2-parameter correction; pairwise deletion) implemented in the MEGA5 program [21], and results were validated by 1000 bootstrap replicates. Genotypes were assigned based on clustering with reference strains from the sequence database of the European Network (<http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet/Databases>) in the phylogenetic tree with >70% bootstrap support, and the Norovirus Genotyping Tool [22] was used to confirm the results. For selected GII.4 samples (those which could not be assigned to a specific variant, the first GII.4 2012 reported outbreak, and four additional randomly selected outbreaks), a larger region of the genome corresponding to the 3' half of ORF2 was sequenced using primers Set7F (5' CATATTCCAGGCAGTCGTAAC3') and Set7R (5' GATTAGGGAACCAAGTCCAGAG3'), which span nucleotides 5958–6773 of the genome (positions according to GU445325).

3.4. NoV quantification in stool

Fecal virus load was determined using a one-step qRT-PCR assay that has been previously described [18]. For selected stool samples (genotyped samples with available epidemiological data), a 10% stool suspension was prepared adding 10 μl of Mengovirus prior to centrifugation, which is used as a process control virus to monitor virus/nucleic acid extraction efficiency. Enzyme efficiency was monitored by adding an *in vitro* transcribed RNA as described elsewhere [23], and according to ISO technical specifications (Norovirus and hepatitis A virus analyses from food and animal feed; ISO/TS 15216-1: 2013).

3.5. Nucleotide sequence accession numbers

Nucleotide sequences were submitted to Genbank under the following accession numbers: KF870579–KF870714. Nucleotide sequences from samples RSBS029/2012/J06.3, RCC07/2012/J04.16, and GIR38/2012/Y29.15 are available upon demand.

3.6. Statistical analysis

Statistical differences between categorical variables were determined using the Fischer's exact test, and comparisons between means were performed using the student *t*-test (unpaired) or the ANOVA analysis (DMS method), using the IBM SPSS[®] Statistics version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *p* values <0.05 were considered statistically significant.

4. Results

4.1. Prevalence and mode of transmission of NoVs in outbreaks of non-bacterial gastroenteritis

A total of 169 outbreaks of non-bacterial acute gastroenteritis were reported between January 2010 and December 2012, affecting a total of 3239 individuals. NoVs were identified as the single agent of gastroenteritis in 128 outbreaks (76%), while 41 outbreaks (24%) remained undiagnosed. Overall, among 122 outbreaks with information regarding genogroup and mode of transmission, 45.1% were foodborne GII outbreaks, 36.1% were person-to-person GII outbreaks, 5.7% were person-to-person GI outbreaks, 4.9% were foodborne GI + GII outbreaks, 2.5% were person-to-person GI + GII outbreaks, 2.5% were waterborne GII outbreaks, 1.6% were foodborne GI outbreaks, 0.8% were waterborne GI outbreaks, and 0.8% were waterborne GI + GII outbreaks. Shellfish accounted for 11 foodborne outbreaks while sandwiches, cake, raw vegetables, durum, meatballs, cured-meat brochettes, and Chinese food

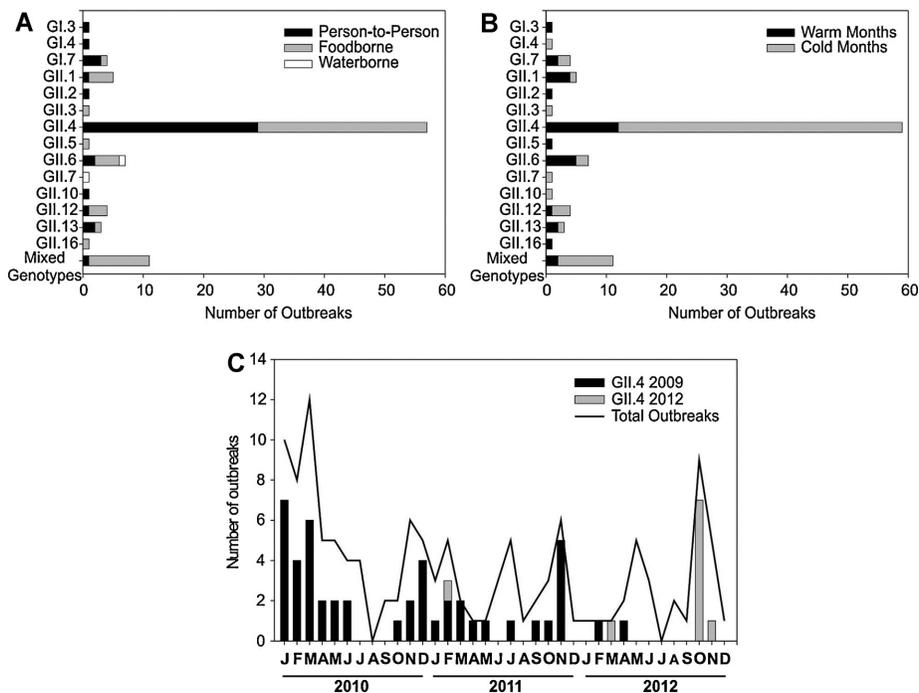


Fig. 1. Major NoV genotypes identified in outbreaks of gastroenteritis in Catalonia between January 2010 and December 2012, according to the mode of transmission (A) and the season in which they occurred (B). Warm months (April–September), cold months (October–March). (C) Monthly distribution of NoV outbreaks occurred in Catalonia during the 3-year period. The solid line indicates the total number of outbreaks over time, and bars indicate the number of outbreaks caused by the 2 most predominant GII.4 strains (2009 and 2012).

(rice and chicken with almonds) were each associated with one outbreak.

4.2. Prevalence and temporal distribution of NoV genotypes identified in outbreaks

Genotype information could be obtained for 103 out of the 128 NoV outbreaks (80.5%), and 3 GI genotypes (GI.3, GI.4, and GI.7) and 12 GII genotypes (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, and GII.21) were detected. Genotype GII.4 was the predominant type, causing 58.2% of all genotyped outbreaks (Fig. 1A and B), and genotypes GI.4, GI.7, GII.1, GII.2, GII.4, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, and GII.21 were isolated in outbreaks caused by multiple strains. GII.4 was isolated in 54% of these outbreaks in combination with one, two or even four other genotypes. Outbreaks caused by multiple genotypes were significantly associated to foodborne transmission (90.9%, $p = 0.042$) (Fig. 1A).

Regarding the temporal distribution of different genotypes, only GII.4 outbreaks were significantly more frequently reported during cold months (83.3%, $p = 0.010$) (Fig. 1B). Only genotypes GII.1, GII.4, GII.6, and GII.7 were regularly detected every year. The monthly distribution of total NoV outbreaks and outbreaks caused by variants 2009 and 2012 of genotype GII.4 throughout the study period is shown in Fig. 1C. During 2010, a good correlation was observed between the total number of outbreaks and the outbreaks caused by GII.4 2009 strain, but in 2011 and 2012, several outbreaks caused by genotypes other than GII.4 occurred also during June–July and May–June, respectively. A clear replacement of the GII.4 2009 strain by the 2012 strain was observed in 2012. Importantly, the first GII.4 2012 strain was detected as early as February 2011 in a

person-to-person outbreak which occurred in a nursing home (outbreak GIR12/2011), being the earliest GII.4 2012 isolate reported worldwide up to date.

4.3. Epidemiological features of outbreaks caused by different genotypes

The epidemiologic characteristics of the outbreaks according to genotype are summarized in Table 1. The average attack rate between GII.13 outbreaks and the one in outbreaks caused by multiple genotypes was significantly different ($p = 0.022$), but there were no other significant correlations. Within GII.4 outbreaks, the average age of the affected individuals, the average attack rate and the average duration of symptoms were not statistically different between 2009 and 2012 variants (60.7 years vs 55.6, 45.7% vs 51.1%, and 2.1 days vs 2.6 days, respectively).

Regarding the distribution of genotypes by age group, the highest diversity was observed in individuals younger than 15 years old, with 10 different genotypes, and decreased with age (Fig. 2). The only genotypes that were detected in all age groups were GII.4 and GII.6.

4.4. Phylogenetic analysis of NoV strains

Genotype information inferred from region C phylogenetic analysis correlated with genotype assignment performed using the Noronet Typing Tool (Figs. 3A,B and 4B). Using this region, all GII.4 strains could be typed at the variant level, with the exception of outbreaks CP84/2011, GIR75/2011, GIR75/2012 and RSBS76/2012 (Fig. 4A, indicated in italics). The use of other

Table 1
Epidemiological features of outbreaks caused by different genotypes.

Genotype	Number of outbreaks	Setting (number of outbreaks)	Total number of affected individuals	Total number of individuals who used health services (%)	Total number of hospitalizations (%)	Average attack rate (%) ^a	Average duration of symptoms (days) ^a
GI.3	1	Private home	ND	ND	ND	ND	ND
GI.4	1	School	9	0 (0)	0 (0)	36	5.0
GI.7	4	Restaurant (1), Healthcare institution (1), Youth hostel/Campground (1), School (1)	52 ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^c	56.1 ± 17.9	2.5 ± 2.1
GII.1	6	Youth hostel/Campground (2), Foodservice/Catering (1), Nursing home (1), School (1), ND (1)	128 ^d	33 (25.8) ^d	0 (0) ^d	57.7 ± 4.4	1.4 ± 0.5
GII.2	1	School	ND	ND	ND	57.5	ND
GII.3	1	Private home	ND	ND	ND	ND	ND
GII.4	60	Nursing home (12), Restaurant (12), Healthcare institution (10), Hotel (8), Foodservice/Catering (4), Private home (4), Community-based group residence (4), Youth hostel/Campground (1), School (1), Others ^b (1), ND (3)	1,759 ^e	265 (15.1) ^e	16 (0.9) ^e	47.6 ± 29.2	2.1 ± 0.9
GII.5	1	Private home	3	3 (100)	0 (0)	60	ND
GII.6	7	Nursing home (2), Restaurant (1), Foodservice/Catering (1), School (1), Others (2)	160 ^d	27 (16.9) ^d	7 (4.4) ^d	36.4 ± 22.1	2.0 ± 0.9
GII.7	1	School	103	7 (6.8)	0 (0)	21.1	1.3
GII.10	1	Nursing home	ND	ND	ND	ND	ND
GII.12	4	School (2), Healthcare institution (1), Restaurant (1)	150	1 (0.7)	1 (0.7)	37.8 ± 15.9	1.3 ± 0.7
GII.13	3	Youth hostel/Campground (2), Restaurant (1)	41	13 (31.7)	0 (0)	21.7 ± 12.0	ND
GII.16	1	Youth hostel/Campground	19	12 (63.2)	0 (0)	48.7	ND
Multiple genotypes	11	Restaurant (6), Private home (2), Foodservice/Catering (1), Hotel (1), Nursing home (1)	122	20 (16.4)	0 (0)	64.2 ± 26.1	2.4 ± 1.4
Total	103		2546	381 (15.0)	24 (0.9)	47.5 ± 27.0	2.1 ± 1.0

ND: no data.

^a Results are expressed as the mean ± the standard deviation of the mean.

^b Travel, community events, workplace.

^c Missing information for 1 outbreak.

^d Missing information for 2 outbreaks.

^e Missing information for 4 outbreaks.

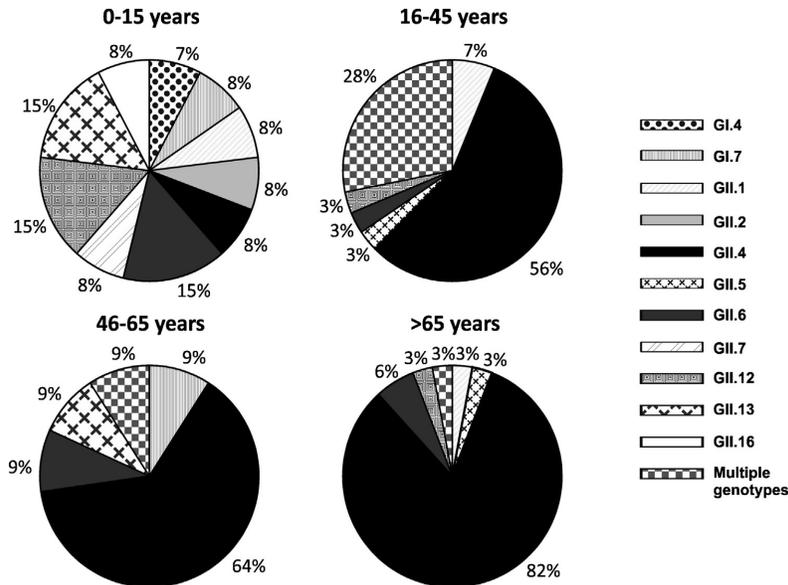


Fig. 2. Prevalence of NoV genotypes in different age groups characterized in Catalonia during the 3-year study period.

algorithms including the HKY851 method was attempted, but similar inconclusive results were obtained (data not shown). These isolates, together with outbreak GIR12/2011 (first GII.4 Sydney 2012 variant isolated in this study period), and 4 additional outbreaks, which were randomly selected (ASPB74/2010, RCC12/2010, RCC15/2010, and TAR02/2012), were chosen to analyze a larger portion of ORF2 including most of the P2 domain (amino acids 307–540 of VP1). Phylogenetic analysis of the 3' end of ORF2 at the nucleotide level indicated that outbreaks ASPB74/2010, RCC12/2010, and RCC15/2010, as well as CP84/2011 and TAR02/2012, were caused by GII.4 2009 variants, while GIR12/2011, GIR75/2012 and RSBS76/2012 outbreaks were caused by GII.4 2012 strains (sequencing of GIR75/2011 outbreak was unsuccessful) (Fig. 4B).

Compared with the corresponding GII.4 reference strains, amino acid changes were detected in some of the two sequenced VP1 coding regions (Fig. 4C and D). All but one of these sites corresponded to previously identified informative sites subject to selective pressure [24–26]. Most of these non-synonymous mutations are located in the VP1 protruding region, but substitutions inside the VP1 shell have also been described [26]. Most of these sites would not be under pressure due to antibody recognition but to the role of the RNA secondary structure for efficient translation [26]. In this

report, we found one previously undescribed mutation in residue 8 (Fig. 4D).

4.5. Analysis of viral load in GII.4 2009 and GII.4 2012 diarrheal specimens

Quantification levels for NoV shedding were compared between samples belonging to GII.4 2009 and GII.4 2012 strains (Table 2), but no statistical differences were observed.

5. Discussion

Data presented in this study refer the molecular characterization of NoV strains that caused outbreaks of gastroenteritis in Catalonia, Spain, between January 2010 and December 2012. Foodborne and person-to-person outbreaks caused by GII strains accounted for 81.2% of all reported NoV outbreaks. As reported elsewhere, GII.4 was the most commonly found genotype [15,27–29]. It was the single isolated genotype in 58.2% of all genotyped outbreaks and it was also present in 6/11 multi-strain outbreaks. GII.4 outbreaks occurred preferentially during cold months and were never waterborne outbreaks. Multi-strain outbreaks were the second most common outbreaks (10.7%), with a higher occurrence in cold months and a significant association with a foodborne origin. Other genotypes isolated with prevalences higher than 5% were GII.6 and GII.1. Although not significantly, foodborne transmission was more frequent among these outbreaks. GII.6 has been the second most prevalent genotype in Japan and it has been associated with high genetic variation [30]. Association between GII.6 and foodborne transmission has also been reported in the US [31], and it was also commonly detected in the environment [18] and in mussels harvested in Spain [19]. GII.1 has also been detected with increased prevalence in Europe in 2011 [32].

Interestingly, two of the genotypes most commonly isolated from river and wastewater samples in our previous study performed between 2007 and 2009 (GI.4 and GII.21) [18] were scarcely detected in the studied outbreaks. GI.4 was also commonly detected

Table 2

Analysis of viral load in diarrheal specimens belonging to GII.4 2009 and 2012 predominant strains.

	GI.4 2009	GI.4 2012
Mean viral load (RNA copies/g)	5.57×10^8	2.12×10^9
Range (RNA copies/g)	1.75×10^7 – 9.05×10^9	8.84×10^7 – 1.94×10^{10}
Number of tested samples	12	7
Age of individuals (range in years)	28–48	3–76
Time of stool collection after the onset of symptoms (range in days)	2–39	2–9

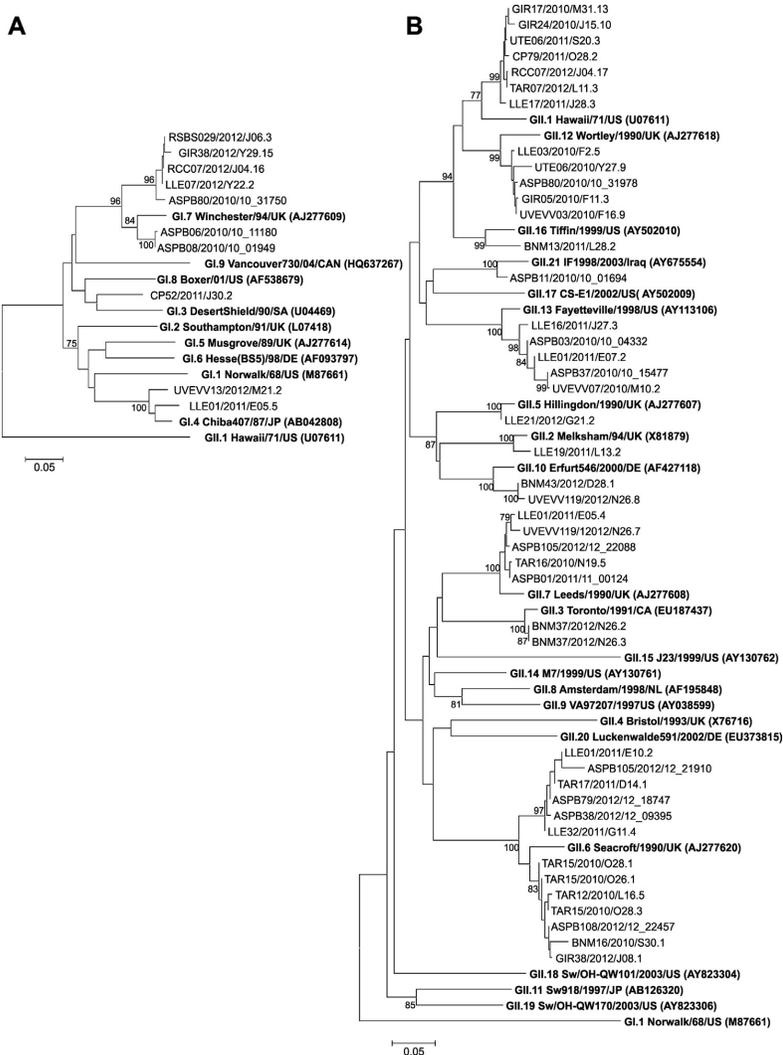


Fig. 3. Phylogenetic analysis of NoV strains isolated in outbreaks of gastroenteritis (region C). Panel A includes all GI genotypes, and panel B includes all GII genotypes except GII.4. The nucleotide dendrogram was inferred using the neighbor-joining method with distance calculation by the Kimura-2-parameter correction implemented in the MEGA5 software [21]. A bootstrap of 1000 replicates was performed and values above 75 are shown in the figure. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Bold indicates reference strains for the respective genotypes. Isolate names are composed of a letter code indicating the geographic region followed by the outbreak number, the year, and the sample name.

in mussels from Spain [19]. These discrepancies may reflect a decrease in prevalence over time, or a combination of high environmental resistance and lower pathogenicity. In contrast, genotypes GI.7, GII.1, GII.5, GII.7, GII.10, GII.12, and GII.13 were isolated in the environment between 2007 and 2009 in less than 2% of samples [18], but have been isolated in a significant number of 2010–2012 outbreaks. These differences might be due to an emerging trend, to a lower persistence in the environment, or to variability in the target region amplified by the qRT-PCR assay, which could improve detection efficiency.

The temporal distribution of outbreaks (Fig. 1C) showed the occurrence of two unexpected peaks in 2011- and 2012-warm months attributable to non-GII.4 strains (GI.3, GI.7, GII.1, GII.2,

GII.6 and GII.13). Of note, most of these outbreaks occurred in youth hostels, campgrounds or schools, highlighting the not negligible importance of NoVs in such settings during school vacation activities. Our surveillance also detected the replacement of GII.4 2009 variant by GII.4 2012 during 2012, mirroring what has been reported elsewhere [10–13]. While most reports indicate that GII.4 2012 predominates since the end of 2012, we detected it in February 2011, being the earliest report of this strain worldwide. Although phylogenetic analysis of this early strain showed a strong clustering with other 2012 strains (Fig. 4A and B), a remarkably high number of amino acid substitutions within the P domain was observed (2.5% of the analyzed VP1 region). Although identical sequences are not found in Genbank, GIR12/2011/F23.5 strain

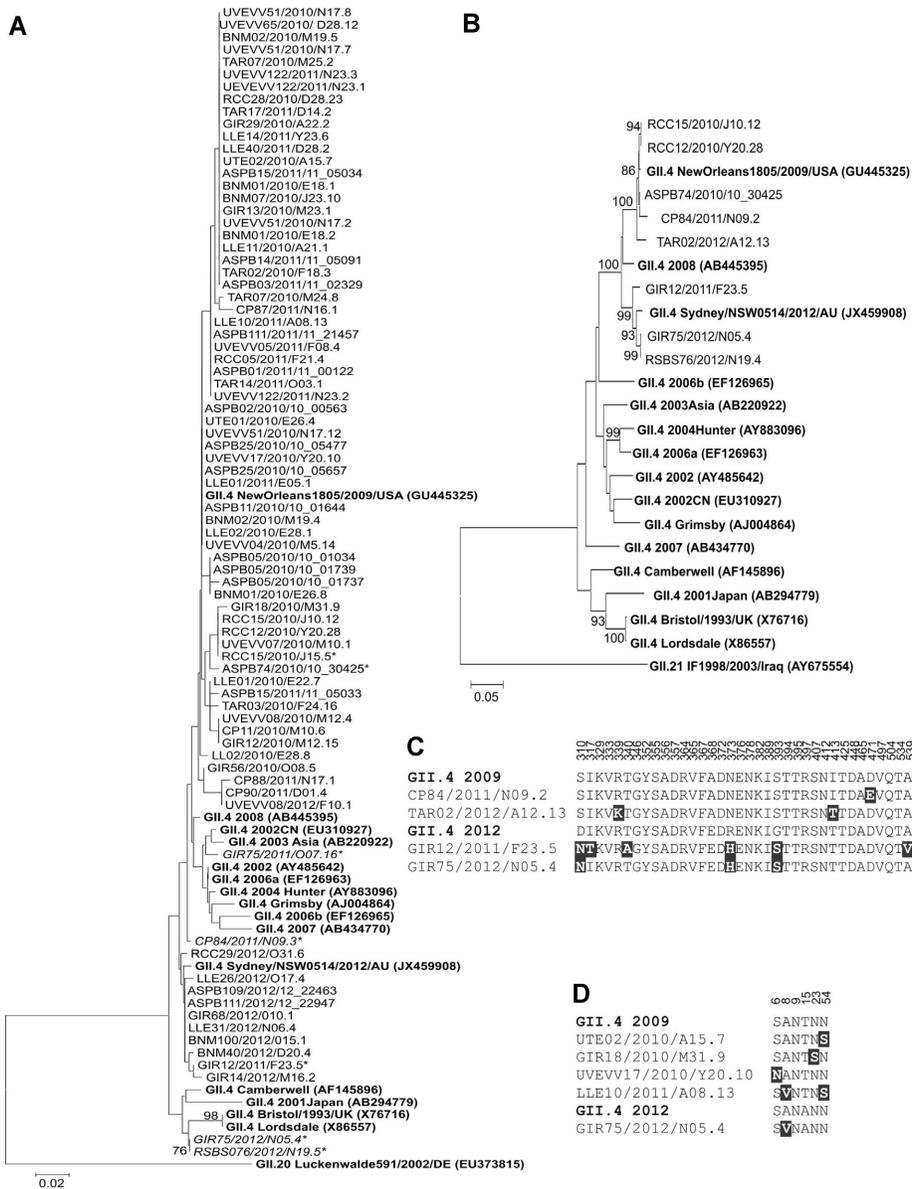


Fig. 4. Phylogenetic analysis of NoVs GII.4 strains isolated in outbreaks of gastroenteritis and amino acid (AA) changes in capsid informative sites. Panel A shows the dendrogram inferred from region C, and panel B shows the dendrogram of selected strains using a 715-nucleotide region of the 3' end of ORF2. Trees were inferred using the neighbor-joining method with distance calculation by the Kimura-2-parameter correction implemented in the MEGA5 software [21]. A bootstrap of 1000 replicates was performed and values above 75 are shown in the figure. The trees are drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Bold indicates reference strains for the respective genotypes. Names written in italics indicate GII.4 isolates that were difficult to type at the variant level. Asterisks indicate isolates that were selected to sequence a larger fragment of ORF2. Isolate names are composed of a letter code indicating the geographic region followed by the outbreak number, the year, and the sample name. Panels C and D show the amino acid changes found in informative sites within studied regions of the VP1 capsid protein: P domain (AA 307–540) (C) and shell domain (AA 1–75) (D). AA numbering is indicated at the top of the alignments. Reference strains are indicated in bold. Residues showing mutations compared to the corresponding reference strain are highlighted in gray boxes.

shares some mutations with strains isolated in France (AGT95928), Australia (AGS08091) and New Zealand (AGS08169). In agreement with previous observations that indicate that GII.4 2012 strains undergo antigenic diversification faster than their predecessor

strains [33], our analysis of the VP1 region in GII.4 2009 and 2012 strains also indicate a higher number of variable positions in 2012 strains, especially at sites which may be important in modulating the antigenic profile of the virus (Fig. 4C and D).

Reports analyzing virulence and severity of disease caused by GII.4 2012 strains compared with other variants are diverse [34,35], and some works have reported that GII.4 2012 outbreaks disproportionately affect older persons in healthcare-related settings transmitted from person to person. Clinical features of the GII.4 2012 outbreaks reported here were similar to the previously predominant GII.4 2009 strain. A high percentage of foodborne GII.4 2012 outbreaks was also detected, and the average age of the affected individuals was 55 years old. Our laboratory has also detected GII.4 2012 strains in cases of sporadic NoV infections in children (data not shown). In fact, the variety of strains that cause outbreaks in the young population has been remarkable, suggesting that immune protection acquired from infection at least with some genotypes may last long enough to prevent reinfection. At the same time, recombination between different viruses, at least between non-abundant genotypes, may be more likely to occur in children than in older individuals.

Compared with other genotypes, the higher fitness of GII.4 strains is associated to a higher rate of evolution of the capsid proteins [6], but other factors may contribute to their success as well. Since higher replication rates may result in higher viral loads, and higher shedding could favor transmission, we examined whether differences exist between GII.4 2009 and GII.4 2012 excretion levels. Our results indicate that these viruses are shed at similar levels. Other factors that may also influence transmission such as particle stability outside the host should be explored too. Although shed at similar levels, GII.4 2012 strains have clearly replaced the previous predominant strain.

In conclusion, this study supports the importance of pursuing surveillance of NoV strains circulating in the community.

Funding

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (Project no. PS09/02516). This work was also supported in part by the Generalitat de Catalunya projects 2009SGR00024 and 2009SGR0042, the Biotechnology Reference Network (XRB), and the project FoodFP7-311846 of the European Commission. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

None of the authors declares any conflict of interest.

Ethical approval

Ethical approval was not required.

Acknowledgements

We are indebted to the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia, and we are grateful for the collaboration of the physicians reporting outbreaks and the technicians of the Epidemiological Surveillance Units of the Department of Health of the Generalitat of Catalonia and the Public Health Agency of Barcelona. The other members of the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia are: M. Alesdà, J. Alvarez, C. Arias, A. Artigues, I. Barrabeig, P. J. Balanya, N. Camps, M. Company, M. Carol, G. Ferrús, N. Follia, P. Godoy, S. Minguell, I. Parrón, A. Rovira, M. R. Sala, R. Torra, J. Torres (Public Health Agency of Catalonia, Barcelona, Spain), D. Ferrer, A. Moreno, M. Sanz (Public Health Agency of Barcelona, Barcelona, Spain), and S. Broner (CIBER Epidemiology and Public Health, Instituto de Salud

Carlos III, Madrid, Spain). We also thank Dr Harry Vennema and his collaborators at the RIVM for assistance in typing difficult strains.

References

- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009;361:1776–85.
- Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. Noroviruses: the leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov Med* 2010;10:61–70.
- Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:544–52.
- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 2013;158:2059–68.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312–23.
- Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 2011;19:233–40.
- Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:1141–9.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus illness: a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J Infect Dis* 2009;200:802–12.
- Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 2010;48:168–77.
- Bennett S, MacLean A, Miller RS, Aitken C, Gunson RN. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill* 2013;18(2), pii:20349.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney – United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013;62:55.
- Fonager J, Barzinci S, Fischer T. Emergence of a new recombinant Sydney 2012 norovirus variant in Denmark, October to December 2012 to 22 March 2013. *Euro Surveill* 2013;18(25), doi:pii:20506.
- van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013;18:8–9.
- Buesa J, Collado B, López-Andújar P, Abu-Mallouh R, Rodríguez Díaz J, GarcíaDíaz A, et al. Molecular epidemiology of calciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 2002;40:2854–9.
- Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, et al. Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol* 2008;80:1288–95.
- Dominguez A, Torner N, Ruiz L, Martínez A, Barrabeig I, Camps N, et al. Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004–2005. *J Clin Virol* 2008;43:126–31.
- Sánchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Roman E, Colomina J, Montero V, Negredo A. Surveillance of human calciviruses in Spain. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1327–9.
- Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ Microbiol* 2012;14:494–502.
- Manso CF, Romalde JL. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in mussels from Galicia (NW Spain). *Food Environ Virol* 2013;5:110–8.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548–57.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar SMEGA5. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–9.
- Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 2011;51:121–5.
- Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3846–55.
- Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, et al. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol* 2009;83:11890–901.
- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, et al. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007;81:9932–41.
- Siebenga JJ, Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Rambaut A, Vennema H, et al. Phylogenetic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000884. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000884>.
- Bernard H, Höhne M, Niendorf S, Altmann D, Stark K. Epidemiology of norovirus gastroenteritis in Germany 2001–2009: eight seasons of routine surveillance. *Epidemiol Infect* 2013;21:1–12.

- [28] Greening GE, Hewitt J, Rivera-Aban M, Croucher D. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis outbreaks in New Zealand from 2002–2009. *J Med Virol* 2012;84:1449–58.
- [29] Lee BE, Preiksaitis JK, Chui N, Chui L, Pang XL. Genetic relatedness of noroviruses identified in sporadic gastroenteritis in children and gastroenteritis outbreaks in northern Alberta. *J Med Virol* 2008;80:330–7.
- [30] Chan-It W, Thongprachum A, Khamrin P, Kobayashi M, Okitsu S, Mizuguchi M, et al. Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008–2009. *J Med Virol* 2012;84:1089–96.
- [31] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009–2013. *J Clin Microbiol* 2013 [Epub ahead of print, PubMed PMID: 24172151].
- [32] Hoffmann D, Mauroy A, Seebach J, Simon V, Wantia N, Protzer U. New norovirus classified as a recombinant GII.g/GII.1 causes an extended foodborne outbreak at a university hospital in Munich. *J Clin Virol* 2013;58:24–30.
- [33] Fonager J, Hindbæk LS, Fischer TK. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill* 2013;18(9), pii:20413.
- [34] Leshem E, Wikswo M, Barclay L, Brandt E, Storm W, Salehi E, et al. Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012–2013. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1231–8.
- [35] Mai H, Jin M, Guo X, Liu J, Liu N, Cong X, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus GII.4 Sydney during Winter 2012–13 in Beijing, China following its global emergence. *PLoS ONE* 2013;8:e71483. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071483>.

Article II: Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings

Autors: Aurora Sabrià, Rosa M. Pintó, Albert Bosch, Rosa Bartolomé, Thais Cornejo, Núria Torner, Ana Martínez, Mercedes de Simón, Angela Domínguez, Susana Guix.

Els manipuladors d'aliments (*Food Handlers*, FHs) i els treballadors d'institucions sanitàries (*Health-Care Workers*, HCWs) poden contribuir a la propagació de HuNoV. L'excreció de HuNoV de forma asimptomàtica entre individus sans és comú, i la implicació de personal infectat amb HuNoV en absència de símptomes en l'aparició de brots en centres sanitaris i en el sector de la restauració és un fet àmpliament documentat. No obstant, no hi ha gaires informes que relacionin si treballar en el sector sanitari o alimentari pot presentar un risc major d'infecció per HuNoV. L'objectiu de l'estudi va ser analitzar la incidència d'infeccions per HuNoV entre FHs i HCWs i determinar la relació amb la presència o absència de símptomes dels dos col·lectius. A més, es va comparar la cinètica d'excreció de virus entre individus simptomàtics i asimptomàtics. Dels brots estudiats durant els 3 anys descrits en l'*article I* es van recollir mostres i dades epidemiològiques dels FHs i HCWs de 57 brots.

Els resultats mostraren que el 59.1% dels treballadors analitzats van ser positius per HuNoV i, en més del 70% dels casos la infecció va tenir lloc en absència de símptomes. Tot i que la taxa d'atac va ser similar en els dos col·lectius, es van trobar diferències significatives entre FHs i HCWs en quan a la prevalença d'infeccions asimptomàtiques. Mentre que el percentatge d'infeccions asimptomàtiques en HCWs va ser de només 28.1%, entre els FHs aquest percentatge va pujar fins a 77.9%. En relació al tipus de transmissió, es van observar significativament més infeccions asimptomàtiques en brots alimentaris que en els persona a persona, i més en restaurant i hotels que no pas en residències de gent gran i centres de salut.

Es va analitzar també la càrrega viral d'un total de 56 FHs i HCWs, i de 43 individus es va recollir mostres seriades fins a no detectar-se HuNoV. Les càrregues víriques en femta van ser similars entre els individus simptomàtics i asimptomàtics, iniciant-se en 7.51 ± 1.80 i $6.49 \pm 1.93 \log_{10}$ còpies genòmiques/g, respectivament, i disminuint fins a 5.28 ± 0.76 i $4.52 \pm 1.45 \log_{10}$ còpies genòmiques/g passats 19 dies.

En 10 brots, es va comparar les seqüències obtingudes pel mètode Sanger del domini variable P2 i de la regió C, altament conservada, dels FHs i HCWs asimptomàtics amb les seqüències aïllades entre els afectats, per tal de confirmar molecularment la relació epidemiològica existent. Es va poder confirmar la relació entre els asimptomàtics i els pacients en 7 dels 10 brots. En dos brots, les seqüències dels asimptomàtics i pacients foren idèntiques i en cinc brots es van trobar 1 o 2 canvis a la seqüència de P2, indicant que els virus eren del mateix grup. En canvi, es van observar dos brots d'institucions sanitàries on la seqüència dels asimptomàtics i dels casos era notablement diferent, amb més de 14 posicions variables en la regió P2, suggerint que les soques circulants en el brot podien tenir més d'un origen, tot i que tampoc es va poder descartar que els canvis fossin deguts a l'evolució del virus dins de l'individu degut a que la mostra havia estat presa passats 11-13 dies de l'inici dels símptomes del primer cas. En aquests casos, l'anàlisi de la regió C, la qual és altament conservada, permeté confirmar que les soques dels asimptomàtics no estaven relacionades amb els casos.

Finalment, s'observà un brot on una mostra recol·lectada a 3 dies després de l'inici de símptomes del primer cas presentava 3 canvis a P2, suggerint que la font d'infecció ja estava contaminada amb una població de virus mixta.

Aquest estudi posa de manifest que la probabilitat d'infectar-se quan es produeix un brot en el lloc de feina és elevat, podent constituir una font de transmissió secundària de HuNoV. A més, degut a que els nivells d'excreció són

similars entre els individus amb i sense símptomes, és important reforçar l'educació sobre les bones pràctiques i les mesures d'higiene entre els treballadors, fins i tot en absència de símptomes, en especial en el sector alimentari.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

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

Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings

Aurora Sabrià^{a,b}, Rosa M. Pintó^{a,b}, Albert Bosch^{a,b}, Rosa Bartolomé^c, Thais Cornejo^c, Núria Torner^{d,e,f}, Ana Martínez^d, Mercedes de Simón^g, Angela Domínguez^{e,f}, Susana Guix^{a,b,*}^a Enteric Virus Group, Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain^b Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), University of Barcelona, Avda Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramanet, Spain^c Laboratory of Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Psg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain^d Department of Health, Generalitat of Catalonia, Roc Boronat 81-95, 08005 Barcelona, Spain^e CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos 5, 28029 Madrid, Spain^f Department of Public Health, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain^g Laboratory of the Public Health Agency, Pl. Lesseps 1, 08024 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form 1 July 2016

Accepted 23 July 2016

Keywords:

Norovirus

Food handler

Healthcare worker

Shedding

Asymptomatic infections

P2 domain

ABSTRACT

Background: Noroviruses (NoV) are highly contagious and the leading cause of nonbacterial outbreaks of gastroenteritis worldwide. Individuals who are infected asymptotically may act as reservoirs and facilitate the transmission of NoV, but the likelihood of workers of becoming infected in outbreak settings has not been systematically studied.

Objectives: We evaluated the occurrence of norovirus infections among workers exposed to the virus in different outbreak settings.

Study design: We screened feces from food handlers and healthcare workers related with gastroenteritis outbreaks, and shedding concentrations over time were calculated from serial samples of infected individuals. Sequence analyses of the capsid P2 domain and region C were used to evaluate linkage between asymptomatic employees and outbreak cases.

Results: Of all employees, 59.1% were positive for NoV, and more than 70% of them were asymptomatic. Asymptomatic infections were significantly more frequent in foodborne compared to person-to-person transmitted outbreaks; and in restaurants and hotels, compared to nursing homes and healthcare institutions. Mean viral loads were similar between symptomatic and asymptomatic individuals, starting at 7.51 ± 1.80 and $6.49 \pm 1.93 \log_{10}$ genome copies/g, respectively, and decreasing to 5.28 ± 0.76 and $4.52 \pm 1.45 \log_{10}$ genome copies/g after 19 days.

Conclusions: The likelihood of becoming infected when a NoV outbreak occurs at the work place is high and similar between food handlers and healthcare workers, but asymptomatic infections are more frequently identified among food handlers. Since shed amounts of viruses in the absence of symptoms are also high, reinforcement of hygiene practices among workers is especially relevant to reduce the risk of virus secondary transmissions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Human norovirus (NoV) is a major cause of acute non-bacterial gastroenteritis worldwide [1]. Food handlers (FHs) and healthcare workers (HCWs) are considered important contributing factors

in the spread of NoV both in foodborne outbreaks as well as in person-to-person transmitted outbreaks occurring in healthcare institutions [2]. Several case reports have confirmed the role of infected FHs in causing outbreaks [3–5], and the percentage of outbreaks in which FHs were involved has been reported to be 34% or 70% [6,7]. In healthcare settings, although NoV nosocomial transmission is mainly caused by symptomatic shedders [8], HCWs have also been shown to transmit several infectious diseases to patients and cause substantial morbidity, mortality and healthcare costs, even if they do not show symptoms [9]. NoV outbreaks in health-

* Corresponding author at: Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: susanaguix@ub.edu (S. Guix).

related institutions linked to infected staff have also been reported [10,11]. Sequence analysis of the most variable region of the capsid gene of viruses has helped in the identification of transmission routes [12–14].

Asymptomatic excretion of NoV among healthy individuals is common, with reported prevalences among healthy adults ranging between 12 and 16% [15,16]. Studies focused on FHs describe similar prevalence in Japan [17], but also lower (1–3.4%) in other countries such as South Korea [18,19]. Asymptomatic shedding is also possible for a short period of time before the onset of symptoms, and may continue between 13–60 additional days after symptoms disappearance [20–22]. Concentrations of shed NoVs are high both for symptomatic and asymptomatic infected individuals, and peak titers of shedding usually occur during the first 5 days after infection. Challenge studies with healthy volunteers have revealed that symptomatic individuals may shed significantly higher concentrations of viruses than asymptomatic individuals [21,22], but other studies involving subjects related to outbreak investigations have not confirmed this observation [20].

While infected FHs and HCWs may play a role in transmission, staff personnel may also be at a higher risk of acquiring NoV infections when an outbreak occurs at their workplace. Contact with a person with gastroenteritis is risk factor for viral acute diarrhea [23,24], but few reports have addressed whether working in the food sector may also pose a higher risk for NoV infections.

2. Objectives

The aim of this study was to analyze the occurrence of NoV infections among FHs and HCWs in outbreak settings. Percentages of subjects who were symptomatically or asymptotically infected were determined for different types of outbreaks and concentrations of NoV shedding were analyzed in correlation with symptoms. Finally, sequence analysis was applied to confirm linkage between cases and asymptomatic individuals.

3. Study design

3.1. Definitions

Norovirus infection was defined as fecal virus excretion detected by RTqPCR [25]. Acute gastroenteritis was defined as diarrheal disease of rapid onset presenting together with nausea, vomiting, fever, or abdominal pain. Individuals fitting with this definition were considered symptomatic individuals. A confirmed case of acute gastroenteritis by NoV was defined as a patient with ≥ 2 loose stools and/or ≥ 2 episodes of vomiting within 24 h, with detection of norovirus in feces.

Table 1

Main epidemiological features of the 59 outbreaks used in the study.

Feature	Description ^c
Type of transmission ^a Setting ^a	Foodborne [35]; person-to-person [20]; waterborne [2] Restaurants/hotels [28]; nursing homes [13]; schools [11]; healthcare institutions [4]; private house [1] GII.4 [29]; GII.1 [4]; GII.6 [3]; GII.12 [2]; GII.7 [1]; GII.10 [1]; GI.7 [1]; multiple genotypes [5]
NoV genotype ^b	
Duration of outbreak in days: range (median)	1–71 (5)
Number of affected individuals: range (median)	3–166 (29)
Attack rate: average \pm standard deviation	44.3 \pm 28.4
Number of workers' samples collected per outbreak: range (median)	1–26 (3)
Days passed between the onset of the outbreak and date of sampling: range (median)	3–36 (10)

^a Information was available for 57 outbreaks.

^b Information was available for 46 outbreaks.

^c Numbers in brackets indicate the number of outbreaks; numbers in parenthesis indicate median values.

3.2. Sample collection

Fecal samples (n=259) and epidemiological data (age, sex, and occurrence and type of symptoms) were collected from all food handlers (FHs) and healthcare workers (HCWs) related to 59 previously reported outbreaks caused by NoV [25]. This number represented all NoV outbreaks reported to the Public Health Agency of Catalonia during 2010–2012, for which samples from workers could be collected. Setting and type of transmission were known for 57 of them. Type of transmission was determined after analyzing the occurrence of an exposure source and the epidemic curve. In point-source outbreaks, cases which occurred after 50 h (maximum incubation period) of the common exposure event were considered secondary cases. Main features for these outbreaks are summarized in Table 1. FHs included cooks (24), kitchen assistants (159), waiters (3), and dining room instructors and assistants (30). HCWs included caregivers (57), entertainers (7), instructors (7), and other staff working at the institution (2). Thirty caregivers who assisted during lunch were simultaneously considered as FH and HCW. In addition, 49 samples were collected from FH and HCW related to 8 gastroenteritis outbreaks which tested negative for NoV.

3.3. NoV screening

All stool samples were screened for NoV by qRT-PCR assays as previously described [25]. In a subset of individuals who were willing to participate, serial fecal samples were collected in approximately 1 week intervals apart after providing informed consent, until NoV was no longer detected. Viral load was determined following the ISO/TS 15216-1:2013 method [25]. Standard curve was constructed using serial dilutions of a plasmid containing the qRT-PCR amplicon for NoV GII.4 [26].

3.4. Strain sequence analysis

Amplification and sequencing of region C and P2 domain were performed by nested PCR using previously described primers [12,25] and primers that were designed for this study (Table 2). Nested PCR conditions used have been previously described [25]. Detection of more than one peak at the same position in the sequence in high quality chromatograms were considered as heterogenic sites, which may indicate the existence of mixed sequences in the sample, and have already been observed by others [27,28]. Nucleotide sequence alignments were performed using Clustal Omega [29].

Strain characterization was performed based on the analysis of the P2 sequence, using the criteria suggested by Sukhrie and coworkers [12], which demonstrates that minor nucleotide

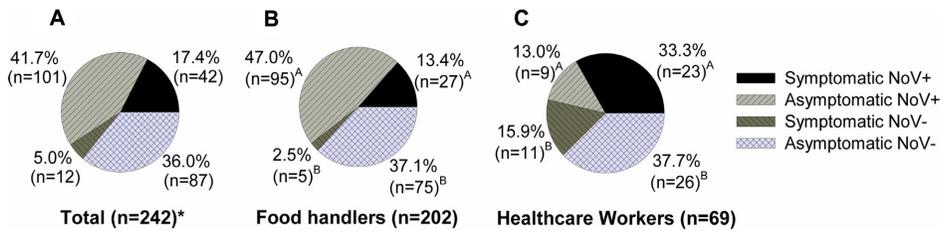


Fig. 1. Distribution of NoV according to symptomatology in the total studied population (A), among food handlers (B) and healthcare workers (C) related to NoV positive outbreaks. Superindex capital letters indicate statistical χ^2 test comparisons showing p values < 0.001. *indicates that 29 individuals were simultaneously considered as FHs and HCWs.

Table 2

Primers used in this study for amplification of P2 domain.

	Primer name	Sequence primer (5'–3')	Position ^a	Reference
1st PCR	P2Forward	GANGATGTCTTCACAGTCTCTT	5661–5682	[25]
	P2Reverse	CATTCTGGGGGAGTAGACA	6435–6454	[12]
Nested PCR	NestedP2F	GTGCCACCCACAGTTGAG	5730–5747	[12]
	NestedP2R	GGGAGTAGACAGTCCAA	6430–6445	[12]
	Set7F	CATATCCAGGCAGTCGTAAC	5958–5980	This study
	Set6R3	GTCGAGCCATTGTCTTGT	5730–5747	This study

^a GenBank accession number GU445325.

changes may appear within an infected individual over time, and suggests that cluster identification should accommodate minor sequence variations. A cluster of sequences showing only 1 or 2 nucleotide substitutions within the 600 bp P2 sequence (variation lower than 0.33%) was suspected to be the same strain, while sequences showing a higher number of substitutions were suspected to be a new strain introduction. Time of sampling was used to assess the possibility of virus having evolved within the host.

3.5. Statistical analysis

Statistical differences were determined by using the Chi-square, the Fischer's exact test, and the student *t*-test (unpaired), using the IBM SPSS® Statistics version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). P values < 0.05 were considered statistically significant.

4. Results

4.1. NoV infection among employees is common during outbreaks, with a higher proportion of asymptomatic infections among food handlers

Of 259 fecal samples, symptoms and occupation information was gathered for 242 individuals. Age of individuals ranged between 20 and 78 years old (median of 40 years old). NoV qRT-PCR test was positive for 59.1% of all samples, and it was similar between the FH and the HCW population (Fig. 1). Among the total 143 NoV positive subjects, only 42 of them (29.4%) reported to have symptoms (Fig. 1A). Of those, 32.4% and 67.6% were considered primary and secondary cases, respectively. On average, 70.6% of NoV-infected subjects were classified as asymptomatic, and this percentage was statistically different among FHs and HCWs ($p < 0.001$) (Fig. 1B and C). While only 28.1% of NoV positive HCWs were asymptomatic, this percentage was as high as 77.9% in the FH population. Among 99 NoV negative subjects, 12 of them (12.1%) reported to have symptoms (Fig. 1A), suggesting that there could be false negative samples or that symptoms could be attributed to other causes. The percentage of NoV negative subjects who were symptomatic was also significantly lower when comparing the FH to the HCW population ($p < 0.01$) (Fig. 1B and 1C).

In addition, in order to estimate the percentage of NoV asymptomatic shedders among individuals who were not epidemiologically related to NoV outbreaks, the virus was also screened in 49 samples from FHs and HCWs that worked at settings were gastroenteritis outbreaks caused by a different agent had occurred. NoV was found only in 1 sample (2%).

4.2. Asymptomatic NoV infections are more common in foodborne outbreaks, as well as in restaurants and hotels

Asymptomatic infection were significantly more abundant in foodborne outbreaks compared to person-to-person transmitted outbreaks, as well as in restaurants and hotels, compared to nursing homes and healthcare institutions ($p < 0.05$) (Table 3). No differences were found depending on the season of the year (63.3% during October–March versus 72.7% during April–September). As for genotype, percentages of asymptomatic individuals among NoV-positive FHs and HCWs were also similar (58.9%, 80.0%, 81.8%, 66.7% and 62.5% for GII.4 2009, GII.4 2012, GII.6, GII.12 and outbreaks caused by multiple strains, respectively).

4.3. NoV shedding concentrations by asymptomatic individuals are as high as those shed by individuals with gastroenteritis

Viral load was examined in a subset of 56 FHs and HCWs. This collection of individuals included 35 symptomatic cases, both primary and secondary infections, and 21 asymptotically infected individuals. In order to reduce the likelihood of including asymptomatic individuals who may have been infected as secondary cases, only asymptomatic cases for whom the stool sample had been collected no later than 7 days after the onset of symptoms of the first symptomatic case of the corresponding outbreak were considered in the analysis. For 43 out of the 56 individuals, one or more serial stool samples were collected at one week intervals. Overall, a total of 128 stool samples were analyzed and 102 of them were positive for NoV. Quantification was performed by qRT-PCR on these NoV positive samples. Of them, 8.8% were excluded due to RT-PCR inhibitions higher than 75% and/or menogovirus recoveries lower than 1%. Raw Cq values for valid samples ranged between 15.29–40.78 (average: 29.83; median: 30.42). RT-

Table 3
Percentage of asymptomatic NoV shedders among FHs and HCWs related to NoV positive outbreaks, according to type of transmission and outbreak setting.

	No. samples/No. outbreaks	No. NoV+ samples (%)	No. NoV Asymptomatic shedders (%)
Type of Transmission			
Foodborne	48/18	33 (68.7%)	27 (81.8%) ^A
Foodborne + Person-to-person	108/16	56 (51.8%)	41 (73.2%) ^A
Person-to-person	80/16	53 (66.2%)	27 (50.9%) ^B
Total	236/50	142 (60.2%)	95 (66.9%)
Outbreak Setting			
Healthcare institution	13/13	13 (100%)	8 (61.5%) ^C
Nursing home	79/20	44 (55.7%)	20 (45.4%) ^C
Restaurant/Hotel	120/42	74 (61.7%)	64 (86.5%) ^D
Total	212/75	131 (61.8%)	92 (70.2%)

Separate χ^2 Tests were used to compare frequencies of NoV+ samples and NoV asymptomatic shedders between groups corresponding to different types of transmission and outbreak settings. Superindex capital letters indicate statistical differences with $p < 0.05$.

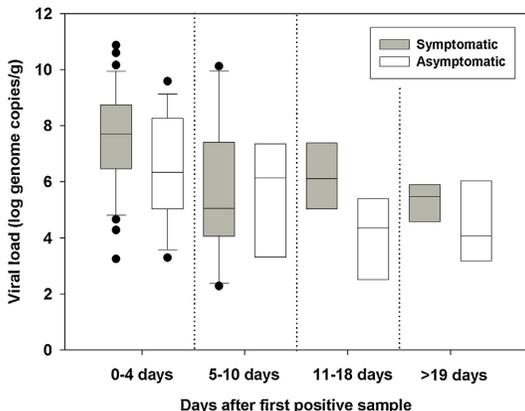


Fig. 2. Viral load shed by symptomatic (grey) and asymptomatic (white) individuals under study over time, represented as box plots [median, quartiles (box), 95% range (whiskers), and outliers (circles)].

PCR inhibition ranged between 0.41–75% (average: 29.47%; median: 28.35%). The average Mengovirus recovery efficiency was 48.63% (median: 45.67%).

At initial sampling, concentrations of NoVs were higher for symptomatic individuals (7.51 ± 1.80 versus 6.49 ± 1.93 log₁₀ genome copies/g), but differences were not statistically significant (Fig. 2). Among asymptomatic individuals, shedding decreased progressively, but for symptomatic subjects, peaked again between 11 and 18 days of sampling. After almost 3 weeks, average viral loads were still 5.28 ± 0.76 and 4.52 ± 1.45 log₁₀ genome copies/g for symptomatic and asymptomatic subjects, respectively. Shedding concentrations did not vary with age (range 21–76 years old) for any subgroup of individuals (data now shown). Although the average viral concentration at initial sampling was higher when symptoms such diarrhea, vomiting or fever were present, differences were not statistically significant (Fig. 3). Duration of symptoms (1–5 days) did not correlate with initial viral shedding concentrations (data not shown).

4.4. Sequence comparison may be used to trace a common source

A subset of 10 outbreaks caused by GII.4 viruses (Table 4) was chosen for a molecular epidemiology analysis to compare the sequence information obtained from asymptomatic FHs and HCWs with sequences isolated from clinical cases. Occurrence of mixed bases could either indicate the existence of quasispecies within the infected individual or an initial coinfection with two different strains. Some of the observed nucleotide substitutions resulted

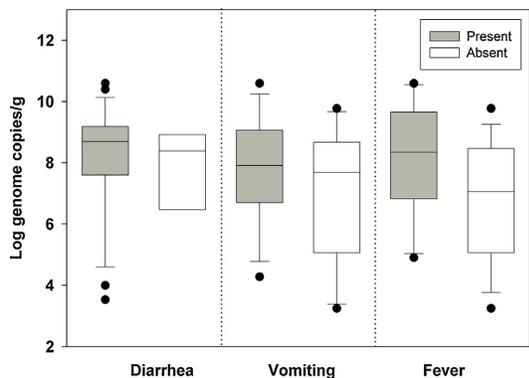


Fig. 3. Initial average viral shedding concentration versus the occurrence of specific symptoms (diarrhea, vomiting and fever).

in amino acid changes in the VP1 coding sequence (N54S, T238S, P294S, A304V, R339K, and I413T), in residues which had been previously classified as informative sites subject to selective pressure [30,31].

Sequences from the P2 domain (approximately 600 nt) were identical only in 2 foodborne outbreaks (TAR02/10 and LLE40/10), confirming the linkage between strains from asymptomatic employees and cases. Outbreak TAR02/10 occurred at a nursing home and suspected food items included chicken purée, fish soup and pasta soup. Outbreak LLE40/10 occurred at a private home caused by a suspected contaminated food. Similarly, for outbreaks GIR13/10, UTE02/10, RCC11/10, ASPB15/11 and LLE26/12, the occurrence of only 1 or 2 mutations within the P2 region indicated that viruses isolated from the asymptomatic and symptomatic individuals belonged to the same cluster. In contrast, P2 sequences were highly divergent with more than 14 variable sites in person-to-person transmitted outbreaks BNM01/10 and UVEVV51/10, suggesting introductions of more than one strain. Since in the absence of symptoms it is not possible to know the time elapsed since the time of infection, and samples were taken after 11–13 days after the onset of symptoms of primary cases of each outbreak, it could not be completely ruled out that changes were due to viral evolution within the host. In these cases, sequence analysis of region C, which shows a higher degree of conservation, allowed us to confirm the existence of different circulating strains in these outbreaks, and rule out the hypothesis that workers were the infectious source for the outbreak (Table 4). Finally, for foodborne outbreak GIR56/10, since 3 variable sites were identified in the P2 sequence (variation of 0.54%) in a sample collected 3 days after the onset of symptoms for the first case, substitutions are

Table 4 Selected outbreaks for molecular sequence analysis, and number of changes observed between the asymptotically infected FH/HCWs and the clinical cases for P2 region and for region C.

Outbreak	Date of outbreak	Setting	Type of transmission	Total number of analyzed samples	Maximum time difference (days) ^a	P2 Region				Region C			
						Length (nt)	Number of nucleotide changes	Number of heterogenic sites	Number of amino acid changes	Length (nt)	Number of nucleotide changes	Number of heterogenic sites	Number of amino acid changes
BNM01/10 TAR02/10	16.1.10	Hospital	Person to person	3	13	720	14	0	4	260	4	0	1
	16.2.10	Nursing home	Foodborne- Person to person	5	2	698	0	0	0	254	0	0	0
GIR13/10 UTEO2/10	18.3.10	Nursing home	Person to person	4	7	605	0	1	0	294	0	0	0
	13.4.10	Hotel	Foodborne- Person to person	5	10	632	0	1	ND	266	0	0	0
RCC11/10 GIR56/10	18.5.10	Restaurant	Foodborne	4	6	660	1	0	0	198	0	0	0
	8.10.10	Hotel	Foodborne	3	3	547	0	3	ND	209	0	0	0
UVVW5/10 LIE40/10	10.11.10	Nursing home	Person to person	5	11	617	14	1	3	260	3	1	1
	22.12.10	Household	Foodborne	3	2	686	0	0	0	285	0	0	0
ASPB15/11 LIE26/12	16.3.11	Nursing home	Person to person	4	21	595	0	2	ND	245	0	0	0
	11.10.12	Restaurant	Foodborne	2	7	572	1	1	0	261	0	0	0

ND: Not determined.

^a Time difference between the sampling date for the asymptomatic sample and the date of onset of symptoms for the first primary cases in each outbreak.

unlikely to have occurred within the infected FH, but rather the infection source was contaminated with a mixed virus population.

5. Discussion

Our study shows that the likelihood of colonization and shedding among employees when a gastroenteritis outbreak occurs at work is remarkable, with 59% of screened individuals being NoV-positive. Since all workers' samples were taken after outbreaks were declared, and due to the lack of epidemiological evidences, it was not possible to evaluate whether workers could have been the source of the infection. In addition, 3/35 foodborne outbreaks were caused by shellfish, which most likely is contaminated prior to harvesting, and food analyses of other food items susceptible to have become contaminated by handling, when performed, did not allow us to confirm NoV contamination. Of note, only 29.4% of NoV infected workers reported to have gastroenteritis symptoms, suggesting that the prevalence of asymptomatic infections among employees is very high and/or that symptom reporting during an outbreak investigation is not reliable. These results highlight the need to adhere to personal and food hygiene among all personnel, regardless of symptomatology to reduce transmission during outbreaks, as well as the importance of not returning to work after a period without symptoms of diarrhea and vomiting [32]. Interestingly, the percentage of asymptomatic NoV positive subjects was significantly lower among the HCW population compared to FHs. Asymptomatically individuals were also significantly more frequent in foodborne outbreaks compared to person-to-person transmitted outbreaks, as well as in restaurants and hotels, compared to nursing homes and healthcare institutions. Since the groups of FHs and HCWs were similar in terms of age or sex, the observed differences in the percentage of asymptotically infected individuals should be attributable to other causes such as differences in survey truthfulness, level of education, job stability, etc. The possibility that survey answers from FHs are less reliable due to factors related to the fear of losing the job due to mala praxis accusations cannot be totally ruled out. Alternatively, the occurrence of symptoms could also be related to the dose at the time of infection, which could be different depending on the setting and the infection source. Data from human volunteers have shown that increasing inoculum dosage is associated to earlier onset and longer duration of symptoms [33], so it could be speculated that exposure to higher levels of contamination by HCWs result in higher percentages of symptomatic infections. Within nursing homes, transmission has been associated with bedside care and exposure to vomit [34], but whether specific practices among FHs represent a higher likelihood of infection remains to be studied. Vomiting has been confirmed to increase the risk of transmission due to its ability to contaminate fomites [35]. In comparison, FHs commonly eat the same as guests and may also become infected by consumption of contaminated food, but they could also become infected by sharing the facilities with infected people, and NoV dosage in these scenarios may be low. According to our results, the likelihood of becoming infected in an outbreak setting is similar between FHs and HCWs, but the likelihood of acquiring gastroenteritis would be higher among the HCWs.

Sequence analysis was used to define whether asymptomatic employees were infected with the same strain as the patients, and confirm that they were linked to the outbreak. In previous studies, sequence changes in the ~600 nt-P2 domain have been observed as early as 4 days following infection and the probability of a change for samples collected at 3 weeks post onset of shedding may increase up to 10% [12]. Although onset of shedding may be extrapolated from modeled shedding kinetics, the time of infection for asymptomatic individuals in real outbreaks is never

certain. Identical P2 sequences and occurrence of minor sequence variations allowed us to suspect linkage between isolates in 7/10 analyzed outbreaks. Substitutions were especially common in two person-to-person transmitted outbreaks occurring at healthcare institutions. Although the lack of information on the time of infection for these workers did not allow us to rule out the possibility of viral evolution within the host, the analysis of region C was essential to confirm that strains infecting these asymptotically infected individuals were unrelated to the outbreaks. These results suggest that infection of HCWs by nosocomial strains may be common.

After 19 days, over 50% of samples remained positive with average loads of 5.28 ± 0.76 and $4.52 \pm 1.45 \log_{10}$ genome copies/g for symptomatic and asymptomatic subjects, respectively. Some reports assessing patients have described that hospitalized individuals or nursing home residents require a longer time to clear a NoV infection, and age has also been shown to affect duration of symptoms and viral excretion [36–38]. Since all our subjects were younger than 78 years old, we did not observe differences in the duration and viral load.

In summary, our data highlight that infected employees may be a potential source of secondary NoV transmission. Since FHs are more likely to be asymptotically infected and the amount of viruses shed in feces are as high as those shed by symptomatic ones, the risk of transmission may be higher in settings where FHs are involved. Given the importance of food handling in the transmission of NoV infections, FHs should be advised to take special care to follow good kitchen hygiene practices. Although there is a proliferation of education materials available [32], focused in disseminating measures to prevent foodborne infections and viral transmission by individuals who have suffered a gastroenteritis, efforts should also be emphasized to spread the message that in the event of a gastroenteritis outbreak at the place of work, employees are likely to become infected, even without showing symptoms. In these scenarios, hygiene practices should be reinforced among all personnel, regardless of symptoms, to reduce the risk of further spreading the illness.

Funding

This work was supported by a grant from the National Plan of I+D+I 2008–2011 and ISIII Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Madrid, Spain (Project no. PS09/02516). This work was also supported in part by the Generalitat de Catalunya projects 2009SGR00024, 2009SGR0042, and the Biotechnology Reference Network (XRB), and by the European Union (Food-FP7-311846). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the University of Barcelona Ethical Committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Acknowledgments

We are thankful to the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia, and we are grateful for the collaboration of the physicians reporting outbreaks and the technicians of the Epidemiological Surveillance Units of the Department of Health of the Generalitat de Catalonia and the Public Health Agency of Barcelona. The other members of the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia are: M. Alsedà, J. Álvarez, C. Arias, A. Artigues, I. Barrabeig, P. J. Balanya, N. Camps, M. Company, M. Carol, G. Ferrús, N. Follia, P. Godoy, S. Minguell, I. Parrón, A. Recasens, A. Rovira, M. R. Sala, R. Torra, J. Torres (Public Health Agency of Catalonia, Barcelona, Spain), D. Ferrer, A. Moreno, M. Sanz (Public Health Agency of Barcelona, Barcelona, Spain), and S. Broner (CIBER Epidemiology and Public Health, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain).

References

- [1] E. Robilotti, S. Deresinski, B.A. Pinsky, *Norovirus Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2015) 134–164.
- [2] G. Belliot, B.A. Lopman, K. Ambert-Balay, P. Pothier, The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection, *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (2014) 724–730.
- [3] C.N. Thornley, J. Hewitt, L. Perumal, S.M. Van Gessel, J. Wong, S.A. David, J.P. Rapana, S. Li, J.C. Marshall, G.E. Greening, Multiple outbreaks of a novel norovirus GII.4 linked to an infected post-symptomatic food handler, *Epidemiol. Infect.* 141 (2013) 1585–1597.
- [4] S. Maritschnik, E.E. Kanitz, E. Simons, M. Hohne, H. Neumann, F. Allerberger, D. Schmid, I. Lederer, A food handler-associated, foodborne norovirus GII.4 Sydney 2012-Outbreak following a wedding dinner, Austria, October 2012, *Food Environ. Virol.* 5 (2013) 220–225.
- [5] I. Barrabeig, A. Rovira, J. Buesa, R. Bartolome, R. Pinto, H. Prellezo, A. Dominguez, Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler, *BMC Infect. Dis.* 10 (2010) 269.
- [6] K.T. Franck, M. Lisby, J. Fonager, A.C. Schultz, B. Bottiger, A. Villif, H. Absalonsen, S. Ethelberg, Sources of calicivirus contamination in foodborne outbreaks, Denmark, 2005–2011 – the role of the asymptomatic food handler, *J. Infect. Dis.* 211 (2014) 563–570.
- [7] A.J. Hall, M.E. Wikswo, K. Pringle, L.H. Gould, U.D. Parashar, Vital signs: foodborne norovirus outbreaks – United States, 2009–2012, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63 (2014) 491–495.
- [8] F.H.A. Sukhrie, P. Teunis, H. Vennema, C. Copra, M.F.C. Thijs Beersma, J. Bogerman, M. Koopmans, Nosocomial transmission of norovirus is mainly caused by symptomatic cases, *Clin. Infect. Dis.* 54 (2012) 931–937.
- [9] R. Huttunen, J. Sryjänen, Healthcare workers as vectors of infectious diseases, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (2014) 1477–1488.
- [10] R.M. Turcios-Ruiz, P. Axelrod, K. St John, E. Bullitt, J. Donahue, N. Robinson, H.E. Friss, Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit, *J. Pediatr.* 153 (2008) 339–344.
- [11] V. Verbelen, M. Bodéus, M.-G. Garrino, A. Scipioni, B. Kabamba, G. Daube, E. Thiry, P. Goubau, Hospital outbreak of gastroenteritis due to norovirus in Belgium, *Acta Clin. Belg.* 59 (2004) 30–33.
- [12] F.H. Sukhrie, P. Teunis, H. Vennema, J. Bogerman, S. van Marm, M.F. Beersma, M. Koopmans, P2 domain profiles and shedding dynamics in prospectively monitored norovirus outbreaks, *J. Clin. Virol.* 56 (2013) 286–292.
- [13] F.H. Sukhrie, M.F. Beersma, A. Wong, B. van der Veer, H. Vennema, J. Bogerman, M. Koopmans, Using molecular epidemiology to trace transmission of nosocomial norovirus infection, *J. Clin. Microbiol.* 49 (2011) 602–606.
- [14] M. Hohne, S. Niendorf, A. Mas Marques, C.T. Bock, Use of sequence analysis of the P2 domain for characterization of norovirus strains causing a large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis in Germany 2012, *Int. J. Med. Microbiol.* 305 (2015) 612–618.
- [15] C.F. Amar, C.L. East, J. Gray, M. Iturriza-Gomara, E.A. Maclure, J. McLauchlin, Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the english case-control infectious intestinal disease study (1993–1996), *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26 (2007) 311–323.
- [16] G. Phillips, C.C. Tam, S. Conti, L.C. Rodrigues, D. Brown, M. Iturriza-Gomara, J. Gray, B. Lopman, Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis, *Am. J. Epidemiol.* 171 (2010) 1014–1022.
- [17] T. Okabayashi, S. Yokota, Y. Ohkoshi, H. Ohuchi, Y. Yoshida, M. Kikuchi, K. Yano, N. Fujii, Occurrence of norovirus infections unrelated to norovirus outbreaks in an asymptomatic food handler population, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 1985–1988.
- [18] A.Y. Jeong, H.S. Jeong, J.S. Lee, Y.C. Park, S.H. Lee, I.G. Hwang, Y.J. Kim, M.Y. Jo, S. Jung, K. Kim, D.S. Cheon, Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 598–600.

- [19] J.H. Yu, N.Y. Kim, E.J. Lee, I.S. Jeon, Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea, *J. Korean Med. Sci.* 26 (2011) 734–739.
- [20] P.F. Teunis, F.H. Sukhrie, H. Vennema, J. Bogerman, M.F. Beersma, M.P. Koopmans, Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections, *Epidemiol. Infect.* 143 (2014) 1710–1717.
- [21] R.L. Atmar, A.R. Opekun, M.A. Gilger, M.K. Estes, S.E. Crawford, F.H. Neill, D.Y. Graham, Norwalk virus shedding after experimental human infection, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 1553–1557.
- [22] A.E. Kirby, J. Shi, J. Montes, M. Lichtenstein, C.L. Moe, Disease course and viral shedding in experimental Norwalk virus and Snow Mountain virus infection, *J. Med. Virol.* 86 (2014) 2055–2064.
- [23] G. Phillips, C.C. Tam, L.C. Rodrigues, B. Lopman, Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community, *Epidemiol. Infect.* 139 (2011) 1676–1686.
- [24] C. Arena, J.P. Amorós, V. Vaillant, K. Ambert-Balay, R. Chikhi-Brachet, N. Jourdan-Da Silva, L. Varesi, J. Arrighi, C. Souty, T. Blanchon, A. Falchi, T. Hanslik, Acute diarrhea in adults consulting a general practitioner in France during winter: incidence, clinical characteristics, management and risk factors, *BMC Infect. Dis.* 14 (2014) 574.
- [25] A. Sabria, R.M. Pinto, A. Bosch, R. Bartolome, T. Cornejo, N. Torner, A. Martinez, M. de Simon, A. Dominguez, S. Guix, Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant, *J. Clin. Virol.* 60 (2014) 96–104.
- [26] F.S. Le Guyader, S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy, R.L. Atmar, Detection and quantification of noroviruses in shellfish, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 618–624.
- [27] B.J. Holzkecht, K.T. Franck, R.T. Nielsen, B. Bottiger, T.K. Fischer, J. Fonager, Sequence analysis of the capsid gene during a genotype II.4 dominated norovirus season in one university hospital: identification of possible transmission routes, *PLoS One* 10 (2015) e0115331.
- [28] J.J. Siebenga, M.F. Beersma, H. Vennema, P. van Biezen, N.J. Hartwig, M. Koopmans, High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution, *J. Infect. Dis.* 198 (2008) 994–1001.
- [29] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539.
- [30] K. Bok, E.J. Abente, M. Realpe-Quintero, T. Mitra, S.V. Sosnovtsev, A.Z. Kapikian, K.Y. Green, Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period, *J. Virol.* 83 (2009) 11890–11901.
- [31] J.J. Siebenga, P. Lemey, S.L. Kosakovsky Pond, A. Rambaut, H. Vennema, M. Koopmans, Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants, *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1000884.
- [32] Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Viruses in Food, CAC/GL 2012, pp. 79.
- [33] R.L. Atmar, A.R. Opekun, M.A. Gilger, M.K. Estes, S.E. Crawford, F.H. Neill, S. Ramani, H. Hill, J. Ferreira, D.Y. Graham, Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus, *J. Infect. Dis.* 209 (2014) 1016–1022.
- [34] M. Petrignani, J. van Beek, G. Borsboom, J.H. Richardus, M. Koopmans, Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies, *J. Hosp. Infect.* 89 (2015) 163–178.
- [35] A.E. Kirby, A. Strebly, C.L. Moe, Vomiting as a symptom and transmission risk in norovirus illness: evidence from human challenge studies, *PLoS One* 11 (2016) e0143759.
- [36] D. Furuya, K. Kuribayashi, Y. Hosono, N. Tsuji, M. Furuya, K. Miyazaki, N. Watanabe, Age, viral copy number, and immunosuppressive therapy affect the duration of norovirus RNA excretion in inpatients diagnosed with norovirus infection, *Jpn. J. Infect. Dis.* 64 (2011) 104–108.
- [37] C.C. Lai, Y.H. Wang, C.Y. Wu, C.H. Hung, D.D. Jiang, F.T. Wu, A norovirus outbreak in a nursing home: norovirus shedding time associated with age, *J. Clin. Virol.* 56 (2013) 96–101.
- [38] D.G. Partridge, C.M. Evans, M. Raza, G. Kudesia, H.K. Parsons, Lessons from a large norovirus outbreak: impact of viral load, patient age and ward design on duration of symptoms and shedding and likelihood of transmission, *J. Hosp. Infect.* 81 (2012) 25–30.

Article III: Characterization of intra- and inter-host norovirus P2 genetic variability in linked individuals by amplicon sequencing

Autors: Aurora Sabrià, Rosa M. Pintó, Albert Bosch, Josep Quer, Damir Garcia-Cehic, Josep Gregori, Angela Domínguez, Mónica Carol, Maria-Rosa Sala-Farré Susana Guix.

La variabilitat genètica és un dels principals factors que contribueixen a l'elevada incidència de HuNoV i per tant el seu estudi és de gran interès. Mentre que en individus infectats de forma crònica i immunodeprimits s'ha documentat que l'aparició de noves variants degut a l'acumulació de mutacions per una baixa fidelitat de replicació vírica és un fenomen freqüent, la distribució de quasiespècies i els patrons d'evolució de HuNoV durant les infeccions agudes en individus immunocompetents no s'ha estudiat gaire, i encara menys en el cas d'infeccions asimptomàtiques. En aquest context, l'objectiu del treball fou analitzar la diversitat viral intra-hoste en individus simptomàtics i asimptomàtics de dos brots descrits als articles I i II, així com l'evolució de la diversitat al llarg del temps d'un fragment de la regió P2 de 450 nucleòtids, mitjançant la plataforma NGS 454/GS-Junior (Roche).

Amb un nombre promig de 2848.38 *reads* per mostra i un llinar de freqüència del 0.1%, es van detectar haplotips minoritaris en 5 de les 8 mostres analitzades. Es va observar una correlació moderadament significativa entre la càrrega viral i el nombre de *reads*, però no entre la càrrega viral i el nombre d'haplotips, ni entre el nombre de *reads* i el nombre d'haplotips. L'anàlisi de les dues mostres del brot RCC11/10, de transmissió alimentària, va confirmar que l'únic haplotip detectat en l'individu A (simptomàtic) també era l'haplotip majoritari identificat en l'individu B (asimptomàtic). En l'individu B, a més a més, es van

identificar 6 haplotips addicionals, dels quals 4 presentaren canvis d'aminoàcid en llocs evolutius. En canvi, en el brot UVEVV51/10, de transmissió interpersonal, es van trobar diferències importants entre els haplotips detectats en els individus simptomàtics i els asimptomàtics. Mentre que els simptomàtics (C i D) compartien l'haplotip majoritari, ni aquest ni cap de les variants minoritàries es van detectar en els individus asimptomàtics (E i F). L'individu F va presentar una diversitat notable, amb diversos canvis d'aminoàcids en 4 dels 6 haplotips detectats. Malgrat ser un nombre de mostres petit, la diversitat viral intra-hoste observada a l'inici de la infecció fou més elevada en els individus asimptomàtics, amb un nombre d'haplotips promig de 4.7, respecte a 2.0 en els individus simptomàtics. De dos individus simptomàtics (A i D), un de cada brot, es va recollir una mostra seriada per tal d'analitzar l'evolució de la diversitat genètica en el temps. En l'individu A l'haplotip detectat es va mantenir estable durant 8 dies post-infecció, mentre que en l'individu D la diversitat viral augmentà de 3 a 18 haplotips en 5 dies (2.8 canvis de nucleòtid per dia). Onze dels 18 haplotips donaren canvi d'aminoàcid en llocs informatius.

En base a les seqüències dels 4 individus que van mostrar diferents variants haplotípiques (B, C, D, i F), es van identificar 29 posicions variables del total de 450 nucleòtids estudiats (6.4%). Més del 95% d'aquests SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) foren transicions, i d'aquestes, la majoria foren d'U-a-C (58.1%). Dels 29 SNPs identificats, més del 65% donaren canvi d'aminoàcid, principalment prop de la regió dels epítops A, D i E, i en dos casos les mutacions es localitzaren directament un a l'epítop D i un a l'epítop E. Aquest estudi, mitjançant NGS ha permès analitzar la població viral en individus amb infeccions simptomàtiques i asimptomàtiques, relacionats epidemiològicament, així

com també conèixer l'evolució viral al llarg del temps dins de l'individu durant una infecció aguda.

Els resultats observats suggereixen que els individus infectats de forma aguda, fins i tot en absència de simptomatologia, també poden actuar com a reservori on poden aparèixer noves variants genètiques.

1 **Characterization of intra- and inter-host norovirus P2 genetic**
2 **variability in linked individuals by amplicon sequencing**

3

4 Aurora Sabrià¹, Rosa M. Pintó¹, Albert Bosch¹, Josep Quer^{2,3}, Damir
5 Garcia-Cehic^{2,3}, Josep Gregori^{2,3,4}, Angela Dominguez⁵, Mónica Carol⁶,
6 Maria-Rosa Sala-Farré⁶ and Susana Guix^{1*} and the Working Group for the
7 Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia

8

9 ¹Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and
10 Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain; Institute of Nutrition
11 and Food Safety (INSA·UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

12 ²Liver Unit. Internal Medicine. Laboratori de Malalties Hepàtiques. Vall
13 d'Hebron Institut Recerca-Hospital Universitari Vall d'Hebron (VHIR-
14 HUVH), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

15 ³Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades
16 Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III,
17 Spain

18 ⁴Roche Diagnostics S.L., Sant Cugat del Vallès, Spain

19 ⁵CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud
20 Carlos III, Madrid, Spain; Department of Public Health, University of
21 Barcelona, Barcelona, Spain

22 ⁶Public Health Agency of Catalonia, Generalitat de Catalunya, Spain

23

24 *Correspondence: Susana Guix; susanaguix@ub.edu; Tel:
25 +34.934039770

26 **Abstract**

27 Noroviruses are the main cause of epidemics of acute gastroenteritis at a
28 global scale. Although chronically infected immunocompromised
29 individuals are regarded as potential reservoirs for the emergence of new
30 viral variants, viral quasispecies distribution and evolution patterns in
31 acute symptomatic and asymptomatic infections has not been extensively
32 studied. Amplicons of 450 nts from the P2 coding capsid domain were
33 studied using next-generation sequencing (454/GS-Junior) platform. Inter-
34 host diversity between symptomatic and asymptomatic acutely infected
35 individuals linked to the same outbreak as well as their viral intra-host
36 diversity over time were characterized. With an average of 2848.38 reads
37 per sample and a cutoff frequency of 0.1%, minor variant haplotypes were
38 detected in 5 out of 8 specimens. Transmitted variants could not be
39 confirmed in all infected individuals in one outbreak. The initial intra-host
40 viral diversity in asymptomatically infected subjects was higher than in
41 symptomatic ones. Viral quasispecies evolution over time within
42 individuals was host-specific, with an average of 2.8 nt changes per day
43 (0.0062 changes per nucleotide per day) in a given symptomatic case.
44 Nucleotide polymorphisms were detected in 28 out of 450 analyzed
45 nucleotide positions, 32.1% of which were synonymous and 67.9% were
46 non-synonymous. Most observed amino acid changes emerged at or near
47 blockade epitopes A, B, D and E. Our results suggest that acutely infected
48 individuals, even in the absence of symptoms, which go underreported
49 and may enhance transmission, may contribute to norovirus genetic
50 variability and evolution.

51

52

53 **Introduction**

54 Norovirus (NoV) is the dominant agent involved in acute
55 gastroenteritis causing one fifth of all cases worldwide, and a major cause
56 of foodborne illness. It is highly infectious [1] and is transmitted by the
57 fecal-oral route, either through contact with infected individuals or
58 through exposure to contaminated food and water, although several other
59 modalities have been described such as via aerosolized viral particles in
60 vomitus [2]. It is responsible for 685 million cases every year affecting
61 both, developed and undeveloped countries. In developed countries, it is
62 estimated that every year NoVs cost \$60 billion due to health care costs
63 like complications and productivity losses due to absenteeism [3].

64 The viral RNA genome is about 7500 nt long with three open
65 reading frames (ORFs). The ORF1 encodes for a polyprotein that is
66 processed co- and post-translationally by the viral protease to generate six
67 mature active nonstructural proteins [4]. ORF2 and ORF3 are translated
68 from subgenomic RNA and encode VP1 and VP2, respectively. VP1 is
69 the major capsid protein and is organized into two domains [5], the shell
70 (S) and the protruding (P) domain. P domain is subdivided into two
71 subdomains P1 and P2. P1 subdomain is more conserved than P2 which is
72 the most exposed region of the capsid and contains the receptor binding
73 function and antigenic determinants [6].

74 NoVs are classified into seven genogroups (GI to GVII) and
75 nearly 40 different genotypes, being genogroup I and II the most relevant
76 for human infection [7]. Genogroup II is the most prevalent one,
77 accounting for 96% of all infections, and GII.4 is currently responsible for
78 70 to 80% of NoV outbreaks worldwide. New genetic clusters of GII.4
79 arise every 2 to 4 years under the pressure of herd immunity [8,9],
80 although the reservoir for such variants is still poorly characterized. In

81 individuals chronically infected with NoV (mostly immunocompromised
82 patients) new variants may arise due to the accumulation of mutations
83 during the protracted virus replication. In addition, a lower replication
84 fidelity of GII.4 pandemic strains has also been related to an increased
85 intra-host diversity [9,10,11,12,13].

86 However, despite it is clear that NoV intra-host population
87 diversity is higher in persistently infected immunocompromised
88 individuals, NoV quasispecies distribution and evolution patterns in both
89 symptomatic and asymptomatic acute infections has not been extensively
90 studied [9]. Genetic variability is one of the main factors contributing to
91 the high incidence of NoV in the human population, and a better
92 knowledge of NoV evolution driving forces is of clinical and public health
93 interest.

94 The aim of this study was to analyze the inter-host NoV GII.4
95 diversity between symptomatic and asymptomatic infected individuals
96 linked to the same outbreak, as well as their viral intra-host diversity over
97 time, using amplicon next-generation sequencing (NGS) approaches.

98

99 **Material and methods**

100 **Sample collection**

101 Fecal samples and epidemiological data (outbreak setting, type of
102 transmission, symptomatology and time of sample collection) were
103 collected from food-handlers and health-care workers of one foodborne
104 outbreak that took place in a restaurant (RCC11/10), and one person-to-
105 person transmission outbreak that affected a nursing home
106 (UVEVV51/10) (Table 1). Day 1 was defined as the first day of sample
107 collection and not the first day of disease onset. For symptomatic
108 individuals, first samples were taken during the first 3 days after the onset

109 of symptoms. A serial stool sample was collected several days later from
110 two individuals with symptomatic infection. Genotype and virus load for
111 all samples were determined in two previous studies [14,15]. All studied
112 samples (n=8) were GII.4 New Orleans 2009. No ethics committee
113 approval was needed and written consent was not obtained because data
114 were anonymized prior to analysis and gathered for outbreak control and
115 public health purposes.

116 **Table 1.** Selected samples from food-handlers (FH) and health care workers (HCW) involved in outbreaks under study analyzed
 117 by NGS.

118

Outbreak	Setting	Type of transmission	Date of outbreak	Subject	Patient description, symptoms, age (years)	Date of specimen collection	Specimen	Viral load (genome copies/g stool)	Reads (22587 total)	Number of Haplotypes
RCC 11/10	Restaurant	Foodborne (shellfish)	18/5/10	Subject A	FH, ill, 43	20/5/10	A-1	8,09x10 ⁹	2700	1
						28/5/10	A-9	1,33x10 ⁹	1795	1
				Subject B	FH, not ill, 36	20/5/10	B-1	7,11x10 ⁹	5038	7
UVEVV 51/10	Nursing home	Person-to-person	10/11/10	Subject C	HCW, ill, 68	17/11/10	C-1	2,07x10 ⁸	1275	2
				Subject D	HCW, ill, 50	17/11/10	D-1	1,32x10 ¹¹	4424	3
						22/11/10	D-6	3,37x10 ¹⁰	3653	18
				Subject E	FH, not ill, 47	17/11/10	E-1	6,98x10 ⁷	2249	1
				Subject F	FH+HCW, not ill	26/11/10	F-1	1,62x10 ⁶	1453	6

119 **RT-PCR**

120 Viral RNA was extracted from 150 µl of 10% stool suspension in
 121 phosphate-buffered saline (pH 7.4) and was stored at -80°C. A two-step
 122 reverse transcription-PCR (RT-PCR) was employed to amplify a 450-bp
 123 region of the NoV genome encoding for P2. Expand Reverse
 124 Transcriptase (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) was used for
 125 the RT and high-fidelity *Pwo* DNA Polymerase (Roche Applied Science,
 126 Basel, Switzerland) for the PCR. Primers are described in Table 2 and
 127 include a template-specific sequence and a universal M13 sequence
 128 required in the multiplex Ultra-Deep Pyro Sequencing (UDPS) reaction
 129 [16]. RT-PCR products were purified from agarose gel bands using the
 130 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Düren,
 131 Germany) and quantified using a NanoDrop1000 spectrophotometer
 132 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

133

134 **Table 2.** Primers used for the study.

Primer	Sequence (5'-3')	Sense	Position ^a	Genome Region
13uNoV5956	<u>GTTGTAAAACGACGG</u> CCAGTGTCAACATCT GCACCTTCAGA ^b	Forward	5925-5945	P2
13dNoV6447	<u>CACAGGAAACAGCT</u> ATGACCTACCCRCTG CATCCGGGCAT ^b	Reverse	6396-6415	P1

135

136 ^a GenBank accession number GU445325

137 ^b Underlined nt correspond to M13 forward and reverse primers,
 138 respectively

139

140

141

142 **Ultra-Deep Pyro Sequencing (UDPS)**

143 UDPS was performed using a 454/GS-Junior deep sequencing
144 platform (Roche, Branford, CT, USA). Briefly, purified RT-PCR products
145 were subjected to 15 cycles of re-amplification for the addition of the
146 multiplex identifier MID signaling. Amplification products were purified
147 using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA),
148 evaluated using the BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (Agilent, Santa
149 Clara, CA, USA), and quantified by PicoGreen assay (Invitrogen,
150 Carlsbad, CA, USA). Massive parallel sequencing was performed in a
151 454/GS-Junior platform (Roche, Branford, CT, USA), using titanium
152 chemistry (GS Junior+ Series, XL+ Kit), which enables sequencing up to
153 700-nt fragments.

154 Computations were made as previously described [17,18,19]. Briefly, the
155 fasta file from the GS-Junior was demultiplexed to obtain a fasta file for
156 each sample and strand. Reads not identified by MID and/or primer were
157 discarded. The allowances were two mismatches in the specific sequence,
158 three on the universal M13 sequence and one on the MID sequence with
159 no indels. Sequences not covering the full amplicon or showing more than
160 2 Ns or 3 gaps were discarded. Sequences not observed on the forward
161 and reverse strands at a minimum abundance of 0.1% were discarded.
162 Different haplotypes were identified and their frequencies computed as
163 the number of observed reads.

164

165 **Phylogenetic analysis**

166 Phylogenetic analysis was performed using the UPGMA method
167 (distance calculation by number of differences method, pairwise deletion)
168 implemented in the MEGA7 program [20], and results were validated by
169 1000 bootstrap replicates.

170

171

172 **Results**

173 **Relation between viral titer and number of reads**

174 NGS was performed on 450-bp P2 amplicons on 8 selected
175 samples. An average of 2848.38 reads per sample were obtained (range
176 1275-5038). Whole genome sequence analyses of other RNA viruses have
177 demonstrated that the depth of coverage improves by increasing viral load
178 [16]. As shown in Fig 1, we observed a moderate correlation ($R^2 = 0.552$)
179 between viral load and number of reads. In general, samples with highest
180 viral load exhibited higher number of reads, while samples with lower
181 titer yielded less reads. No correlation was found between viral load and
182 number of haplotypes ($R^2=0.070$), neither between number of reads and
183 number of haplotypes ($R^2=0.143$).

184

185 **Fig 1. Correlation between viral titer in stool (log genome copies/g)**
186 **and number of reads.**

187

188 **Inter- and intra-host diversity between outbreak-linked symptomatic** 189 **and asymptomatic cases**

190 Samples from two subjects were analyzed in RCC11/10 foodborne
191 outbreak (subjects A and B). The single haplotype found in subject A was
192 also the most common haplotype occurring in subject B (98%), who was
193 infected from the same source but who did not show symptoms (Fig 2A).
194 Of the other 6 minor haplotypes observed in subject B, 4 of them
195 presented an amino acid change at evolving sites: P313L, I330T, T394I
196 and P427L (Table 3 and Fig 3A).

197

198 **Fig 2. Comparison of the intra-host distribution of NoV haplotypes.**
199 Each unique haplotype is represented by alternate gray shading. (A)

200 Subjects from RCC11/10 outbreak. **(B)** Subjects from UVEVV51/10
 201 outbreak. Asterisk indicate serial sample.

202 **Table 3.** Amino acid differences between the haplotypes and GII.4
 203 reference strains in RCC11/10 outbreak.

	VP1 Amino acid Position					
	P2					P1
	Epitope A			Epitope D	Epitope E	
	294	313	330	394	413	427
2009 New Orleans (GU445325)	P	P	I	T	I	P
2012 Sydney (JX459908)	T	P	I	T	T	P
A-1 Hpl.1_100%	P	P	I	T	I	P
A-9 Hpl.1_100%	P	P	I	T	I	P
B-1 Hpl.1_97.98%	P	P	I	T	I	P
B-1 Hpl.2_0.85%						
B-1 Hpl.3_0.34%						L
B-1 Hpl.4_0.24%						
B-1 Hpl.5_0.22%		L				
B-1 Hpl.6_0.2%			T			
B-1 Hpl.7_0.18%				I		

204

205 **Fig 3. Phylogenetic analysis of haplotypes from RCC11/10 (A) and**
 206 **UVEVV51/10 (B) outbreak based on 450 bp of the P2 region.** The
 207 nucleotide dendrogram was inferred using the UPGMA method with
 208 distance calculation by number of differences method using the MEGA7
 209 software. A bootstrap of 1000 replicates was performed, and values above
 210 75 are shown. Bold indicates reference strains. Haplotypes names are
 211 composed of sample name, number of haplotype.

212

213 Five samples from four patients were analyzed from the
 214 UVEVV51/10 outbreak. The data revealed marked differences between

215 symptomatic and asymptomatic subjects. While symptomatic subjects C
216 and D shared the most abundant haplotype, neither this haplotype nor any
217 of the minor variants detected in these individuals were found in
218 asymptomatic subjects E and F (Fig 2B and 3B). While all 5 haplotypes
219 identified in the first specimen for subjects C and D only differed in
220 synonymous changes, the single haplotype found in subject E, and the
221 most abundant haplotype found in subject F, both asymptotically-
222 infected, differed in 2-3 amino acid positions (Table 4). Genetic diversity
223 was especially notable in asymptomatic subject F, with 4 out of the 6
224 identified haplotypes containing several amino acid changes (Table 4).
225 These results suggest either multiple sources of infection or a high degree
226 of virus evolution within the selected infected individuals. Compared to
227 GII.4 New Orleans reference strain, all haplotypes identified in subjects C
228 and D differed in 2 common amino acids (P294S and I413T), and all but
229 one also differed at an additional site (R339K) (Table 4). Haplotypes
230 found in subjects E and F were more closely related to GII.4 New Orleans
231 reference strain (Fig 3B), and only the haplotype identified in subject E
232 showed P294S and R339K substitutions. All observed non-synonymous
233 changes had been previously described [11,21,22].

234 Overall, the intra-host viral diversity in asymptotically infected
235 subjects (B, E and F) at day 1 was higher than in symptomatic patients (A,
236 C and D). Although differences were not statistically significant, the
237 initial average of haplotypes per subject was of 4.7 in asymptomatic
238 subjects versus 2.0 in symptomatic ones.

Table 4. Amino acid differences between the haplotypes and GII.4 reference strains in UVEVV51/10 outbreak.

	VP1 Amino acid Position																	
	P2											P1						
			Ep. A									Ep. E						
	289	293	294	314	339	356	358	380	399	404	407	413	416	426	433	434	436	
2009 New Orleans (GU445325)	D	I	P	T	R	A	F	N	E	V	S	I	V	F	F	F	S	
2012 Sydney (JX459908)	D	I	T	T	R	A	F	N	E	V	S	T	V	F	F	F	S	
C-1 Hpl.1_97.1%			S		K							T						
C-1 Hpl.2_2.9%			S		K							T						
D-1 Hpl.1_96.86%			S		K							T						
D-1 Hpl.2_2.87%			S		K							T						
D-1 Hpl.3_0.27%			S		K							T						
D-6 Hpl.1_93.1%			S		K							T						
D-6 Hpl.2_2.87%			S		K							T						
D-6 Hpl.3_0.63%			S		K		L					T						
D-6 Hpl.4_0.57%			S		K							T						
D-6 Hpl.5_0.38%			S	A	K							T						
D-6 Hpl.6_0.3%			S		K							T						
D-6 Hpl.7_0.27%			S		K							T						
D-6 Hpl.8_0.22%		T	S		K							T						
D-6 Hpl.9_0.19%			S		K			D				T						

D-6 Hpl.10_0.19%			S		K							T					
D-6 Hpl.11_0.19%			S		K							T			L		
D-6 Hpl.12_0.19%			S		K							T				L	
D-6 Hpl.13_0.16%			S		K							T	A				
D-6 Hpl.14_0.16%			S		K			G				T					
D-6 Hpl.15_0.14%			S		K							T					
D-6 Hpl.16_0.14%			S		K					I		T					
D-6 Hpl.17_0.14%			S									T					
D-6 Hpl.18_0.14%	G		S		K							T					
E-1 Hpl.1_100%			S		K												
F-1 Hpl.1_92.64%																	
F-1 Hpl.2_3.37%																	
F-1_Hpl.3_2.62%						V											
F-1_Hpl.4_0.83%														S			
F-1_Hpl.5_0.28%									M								
F-1_Hpl.6_0.28%																	P

241 **Intra-host evolution diversity**

242 While the intra-host viral diversity initially observed in
243 asymptotically infected subjects (B, E and F) was higher than in
244 symptomatic patients (A, C and D), diversity evolution over time for the 2
245 individuals with a serial sample (A and D) showed markedly different
246 trends. While in subject A, who was 43 years old, the single initial
247 haplotype remained stable over the 8 days of infection, in subject D, a 50
248 year-old woman, NoV population diversity increased from 3 to 18
249 haplotypes in only 5 days (Table 1). Of note, this subject was also the one
250 with the highest viral load. The phylogenetic analysis showed that of the 3
251 initial haplotypes in D-1, the most abundant haplotype slightly decreased
252 from 96.9% to 93.1%, the second haplotype remained at a stable
253 frequency of 2.87% and the third haplotype slightly increased from 0.27%
254 to 0.57% (Fig 3B). During the following 5 days, variation occurred in
255 14/450 nt positions, which represents an average of 2.8 nt changes per day
256 and 0.0062 changes per nucleotide per day. At the amino acid level, all 3
257 initial haplotypes detected in subject D were synonymous, and 11 out of
258 the 18 evolved haplotypes contained amino acid changes (61.1%) at
259 previously identified informative sites: D289G, I293T, T314A, F358L,
260 N380D, E399G, S407I, V416A, F433L, and F434L (Table 4).

261

262 **Quasispecies analysis**

263 Among all sequence variants isolated from the quasispecies from the
264 4 subjects that showed variation in the studied region (B, C, D, and F), 29
265 out of 450 analyzed nucleotide positions were variable (6.4%). Of these
266 single nucleotide polymorphisms (SNPs), 34.5% were synonymous and
267 65.5% were non-synonymous.
268 Of note, 96.5% of these substitutions were transitions (58.1% of the
269 transitions were substitutions U-to-C, 19.4 % were A-to-G), and only
270 3.5% were transversions (G-to-U) (Table 5). Since NoV mutants with a

271 high proportion of U-to-C and A-to-G transitions have been described in
272 clinical samples and double-stranded RNA-specific adenosine deaminases
273 (ADAR)-mediated editing of the viral RNA was suggested as the
274 molecular mechanism responsible for them [23], we analyzed their
275 sequence context. Although the chi-square test did not show significant
276 differences compared to the percentages found for conserved sites, of all
277 U-to-C transitions, the 3' neighbor nucleotide was U in 40% of cases, A in
278 26.7%, G in 20% and C in 13.3%, which tend to the sequence context
279 compatible with ADAR-mediated editing of the viral RNA.
280

281 **Table 5.** Characterization of mutant spectrum found in fecal specimens.

Sample	Mutations ^a / Nucleotides Sequenced	Mutations					Nucleotide Mutation Frequency ^c		Amino Acid Mutation Frequency ^c		S _N ^d
		Ts ^b	Tv ^b	Nsyn ^b	Syn ^b	Indel ^b or Stop	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	
B-1	102/2267100	6	0	4	2	0	2.65×10 ⁻⁶	4.50×10 ⁻⁵	5.29×10 ⁻⁵	6.22×10 ⁻⁵	0.02
C-1	37/573750	1	0	0	1	0	1,74×10 ⁻⁶	6,45×10 ⁻⁵	0	0	0.02
D-1	139/1990800	2	0	0	2	0	1,00×10 ⁻⁶	6,98×10 ⁻⁵	0	0	0.02
D-6	252/1643850	16	1	11	6	0	1,03×10 ⁻⁵	1,53×10 ⁻⁴	2.01×10 ⁻⁵	1.70×10 ⁻⁴	0.05
F-1	107/653850	5	0	1	4	0	7,65×10 ⁻⁶	1,64×10 ⁻⁴	1.84×10 ⁻⁵	2.66×10 ⁻⁴	0.05

^a Mutations are those that vary relative to the corresponding consensus sequence. Nucleotides sequenced are the total number of nucleotides sequenced.

^b The mutations are classified into: transitions (Ts), transversions (Tv), nonsynonymous (Nsyn), synonymous (Syn) and insertion/deletion (Indel or Stop).

^c The minimum nucleotide mutation frequency is the number of different mutations found divided by the total number of

nucleotides sequenced. The maximum nucleotide mutation frequency is the total number of mutations found divided by the total number of nucleotides sequenced. The maximum amino acid mutation frequency is the total number of nonsynonymous mutations divided by the number of amino acids encoded in the sequence analyzed. Mutation frequencies are expressed as substitutions per nucleotide or amino acid substitutions per amino acid.

^d The Shannon entropy was calculated as $S_N = [-\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, where p_i is the frequency of each sequence and N is the total number of sequences.

283 At the amino acid level, the majority of the observed changes emerged at
284 or near epitopes A, D and E, while some others were located at internal regions
285 of the P dimer (Tables 3 and 4, and Fig 4) [11,21,22,24]. No changes were
286 observed in HBGA binding pocket sites. Identified substitutions matched
287 previously identified changes between different GII.4 variants (VP1 residues
288 289, 293, 294, 313, 314, 330, 339, 356, 358, 380, 394, 399, 404, 407, 413, 416,
289 426, 427, 433, 434, and 436). In two different individuals, mutations were
290 detected at specific amino acids directly involved in epitope D (T394I) and
291 epitope E (S407I) among the minor variants, suggesting that they may affect
292 antibody recognition and HBGA binding.

293

294 **Fig 4. Amino acid variations in P domain.** Amino acid changes observed in
295 minor variants (yellow) were highlighted on the GII.4 P domain (side view),
296 using the GII.4 2012 P2 domain structure (PDB id 4OOS; available at
297 <https://www.rcsb.org/structure/4OOS>). The reference structure shows epitopes A
298 (red), C (green), D (pink) and E (brown). The Jmol software was used to localize
299 the amino acid residues (Jmol: an open-source Java viewer for chemical
300 structures in 3D. <http://www.jmol.org/>.)

301

302 **Discussion**

303 In this work we used amplicon-NGS analysis to investigate the viral
304 population of selected individuals linked to the same outbreak, as well as to
305 analyze the intra-host NoV evolution dynamics over time. Since all investigated
306 subjects suffered an acute infection, viral populations observed were highly
307 homogeneous as expected. However, individuals who were asymptotically
308 infected had a higher haplotype diversity, suggesting that they may act as a
309 reservoir of novel genetic variants. Asymptotically infected individuals are
310 usually underreported and may transmit the virus in the absence of maximized
311 hygiene habits.

312 Of note, the pattern of evolution of NoV variability over time differed in
313 the 2 analyzed symptomatic subjects. While the single initial haplotype was
314 maintained in one of them (subject A) during at least 8 days, diversity in subject
315 D, which also was initially higher, increased from 3 to 18 haplotypes in only 5
316 days, revealing an average of 0.0062 nucleotide changes per nucleotide per day.
317 Although still remarkable, this variation rate is significantly lower than what was
318 described for immunocompromised patients chronically infected with NoV,
319 which ranged between 0.03 to 0.37 nucleotide changes per day considering the
320 full genome consensus sequence variation over time [13]. In addition to
321 unknown individual factors, such as genetic differences or the history of
322 previous infections by different strains of each subject, the degree of diversity in
323 the transmitted/founding population that initiated the infection in both
324 individuals may have also been different. Although our analysis did not indicate
325 a correlation between haplotype diversity and viral load within a given sample,
326 the initial viral load may be important in determining the evolution pattern.
327 Individual D, who had the highest initial viral load at day 1 showed the highest
328 diversity over time.

329 The effect of other factors related to the host on the degree of intra-host
330 haplotype diversity could be especially observed in foodborne outbreak
331 RCC11/10, which had been caused by a common source (contaminated
332 shellfish). In this outbreak, a greater level of variability was found in the subject
333 who did not develop symptoms. The relationship between the immune response
334 raised to clear infection and the occurrence of symptoms is still poorly
335 understood, and although a larger number of asymptomatic infected individuals
336 should be tested to confirm this idea, our observations suggest that people
337 infected by NoV who do not suffer symptoms may act as a reservoir for viral
338 antigenic variants. While a properly functioning immune response may induce a
339 higher fixation rate of mutations [25], it would be interesting to study whether
340 symptomatology and/or virus severity may also affect it.

341 The NGS analysis of samples belonging to UVEVV51/10 outbreak
342 occurring at a nursing home allowed us to confirm earlier results reported by
343 Sanger sequencing [15]. While subjects C and D shared some of the haplotypes,
344 sequences detected in subjects E and F were markedly different, suggesting
345 more than one introduction of NoV in the nursing home. However, since
346 transmission has been shown to be an important source of diversity and minor
347 variants at frequencies as low as <0.01% have been shown to be efficiently
348 transmitted from a donor to a recipient [9], viral transmission between subjects C
349 or D and E and F cannot be completely ruled out. Quality filters performed
350 during our NGS analysis excluded haplotypes at frequencies lower than 0.1%.
351 Indeed, the type of transmission event (foodborne, fecal-oral, vomit-oral, etc)
352 may also affect viral population diversity. Workers at nursing homes may be
353 frequently exposed to episodes of vomiting and diarrhea and minor variants may
354 disseminate more easily [26]. Indeed, the total number of different haplotypes
355 found in the nursing home outbreak was higher than in the foodborne outbreak.

356 It is described that NoV GII.4 is able to generate new antigenic variants
357 that have the potential to escape herd immunity by accumulation of mutations at
358 major blockade epitopes [27,28,29,30]. In our study, numerous SNPs were found
359 in sequence variants from both outbreaks, and 21 of them produced amino acid
360 changes at sites previously determined to be functionally significant. Some of
361 these changes occurred at or near described epitopes A, B, D, and E, while none
362 of them affected any of the described receptor binding pocket sites.

363 In summary, although evolution of viral population within an infected
364 host may be subject-specific, NGS analysis is useful to characterize the
365 quasispecies diversity and evolution over time, and may be a powerful tool to
366 understand and confirm viral transmission between different hosts. To highlight,
367 individuals who were asymptotically infected had a higher haplotype
368 diversity, suggesting that they may act as a reservoir of novel genetic variants.

369 **Acknowledgements**

370 We are indebted to the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute
371 Gastroenteritis in Catalonia, and we are grateful for the collaboration of the
372 physicians reporting the outbreaks and the technicians of the Epidemiological
373 Surveillance Units of the Department of Health of the Generalitat of Catalonia
374 and the Public Health Agency of Barcelona. The other members of the Working
375 Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia are: M.
376 Alsedà, J. Álvarez, C. Arias, A. Artigues, I. Barrabeig, P. J Balanyà, N. Camps,
377 M. Company, G. Ferrús, N. Follia, P. Godoy, S. Minguell, I. Parrón, A.
378 Recasens, A. Rovira, R. Torra, J. Torres (Public Health Agency of Catalonia,
379 Barcelona, Spain), D. Ferrer, A. Moreno, M. Sanz (Public Health Agency of
380 Barcelona, Barcelona, Spain), and S. Broner (CIBER Epidemiology and Public
381 Health, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain).

382

383 **References**

- 384 1. Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, et al. (2008) Norwalk
385 virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80: 1468-1476.
- 386 2. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA (2015) Norovirus. *Clin Microbiol Rev*
387 28: 134-164.
- 388 3. Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY (2016) Global
389 Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLOS ONE* 11:
390 e0151219.
- 391 4. Thorne LG, Goodfellow IG (2013) Norovirus gene expression and replication.
392 *J Gen Virol*.
- 393 5. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, et al. (1999) X-
394 ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:
395 287-290.

- 396 6. Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, Baric RS (2012) Genetic mapping
397 of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in
398 escape from human herd immunity. *J Virol* 86: 1214-1226.
- 399 7. Vinje J (2015) Advances in laboratory methods for detection and typing of
400 norovirus. *J Clin Microbiol* 53: 373-381.
- 401 8. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, et al. (2009) Norovirus
402 illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4
403 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 200: 802-812.
- 404 9. Bull RA, Eden JS, Luciani F, McElroy K, Rawlinson WD, et al. (2012)
405 Contribution of intra- and interhost dynamics to norovirus evolution. *J*
406 *Virol* 86: 3219-3229.
- 407 10. Bull RA, White PA (2011) Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends*
408 *Microbiol* 19: 233-240.
- 409 11. Debbink K, Lindesmith LC, Ferris MT, Swanstrom J, Beltramello M, et al.
410 (2014) Within-host evolution results in antigenically distinct GII.4
411 noroviruses. *J Virol* 88: 7244-7255.
- 412 12. Hoffmann D, Hutzenthaler M, Seebach J, Panning M, Umgelter A, et al.
413 (2012) Norovirus GII.4 and GII.7 capsid sequences undergo positive
414 selection in chronically infected patients. *Infect Genet Evol* 12: 461-466.
- 415 13. van Beek J, de Graaf M, Smits S, Schapendonk CME, Verjans G, et al.
416 (2017) Whole-Genome Next-Generation Sequencing to Study Within-
417 Host Evolution of Norovirus (NoV) Among Immunocompromised
418 Patients With Chronic NoV Infection. *J Infect Dis* 216: 1513-1524.
- 419 14. Sabria A, Pinto RM, Bosch A, Bartolome R, Cornejo T, et al. (2014)
420 Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain
421 during the emergence of GII.4 2012 variant. *J Clin Virol* 60: 96-104.
- 422 15. Sabria A, Pinto RM, Bosch A, Bartolome R, Cornejo T, et al. (2016)
423 Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the
424 virus in outbreak settings. *J Clin Virol* 82: 119-125.

- 425 16. Nasheri N, Petronella N, Ronholm J, Bidawid S, Corneau N (2017)
426 Characterization of the Genomic Diversity of Norovirus in Linked
427 Patients Using a Metagenomic Deep Sequencing Approach. *Front*
428 *Microbiol* 8: 73.
- 429 17. Quer J, Gregori J, Rodriguez-Frias F, Buti M, Madejon A, et al. (2015)
430 High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep
431 sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J Clin*
432 *Microbiol* 53: 219-226.
- 433 18. Gregori J, Esteban JI, Cubero M, Garcia-Cehic D, Perales C, et al. (2013)
434 Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon
435 HCV minor variants. *PLoS One* 8: e83361.
- 436 19. Gregori J, Salicru M, Domingo E, Sanchez A, Esteban JI, et al. (2014)
437 Inference with viral quasispecies diversity indices: clonal and NGS
438 approaches. *Bioinformatics* 30: 1104-1111.
- 439 20. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary
440 Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:
441 1870-1874.
- 442 21. Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, et al.
443 (2007) Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from
444 1995 to 2006. *J Virol* 81: 9932-9941.
- 445 22. Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, et al.
446 (2013) Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in
447 evolving blockade epitopes. *J Virol* 87: 2803-2813.
- 448 23. Cuevas JM, Combe M, Torres-Puente M, Garijo R, Guix S, et al. (2016)
449 Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing.
450 *Infect Genet Evol* 41: 233-239.
- 451 24. Carmona-Vicente N, Vila-Vicent S, Allen D, Gozalbo-Rovira R, Iturriza-
452 Gomara M, et al. (2016) Characterization of a Novel Conformational
453 GII.4 Norovirus Epitope: Implications for Norovirus-Host Interactions. *J*
454 *Virol* 90: 7703-7714.

- 455 25. Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, et al.
456 (2008) High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness
457 among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J*
458 *Infect Dis* 198: 994-1001.
- 459 26. Petrigani M, van Beek J, Borsboom G, Richardus JH, Koopmans M (2015)
460 Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for
461 spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J*
462 *Hosp Infect* 89: 163-178.
- 463 27. Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA (2010) Rapid evolution of
464 pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* 6: e1000831.
- 465 28. Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS (2011) Norovirus GII.4 strain
466 antigenic variation. *J Virol* 85: 231-242.
- 467 29. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, et al.
468 (2012) Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic
469 variation. *PLoS Pathog* 8: e1002705.
- 470 30. Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Costantini V, Beltramello M, et
471 al. (2013) Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain
472 correlates with escape from herd immunity. *J Infect Dis* 208: 1877-1887.

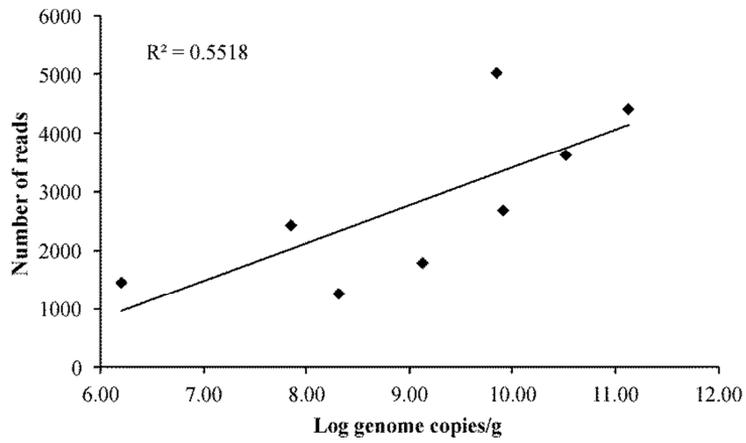


Fig 1. Correlation between viral titer in stool (log genome copies/g) and number of reads.

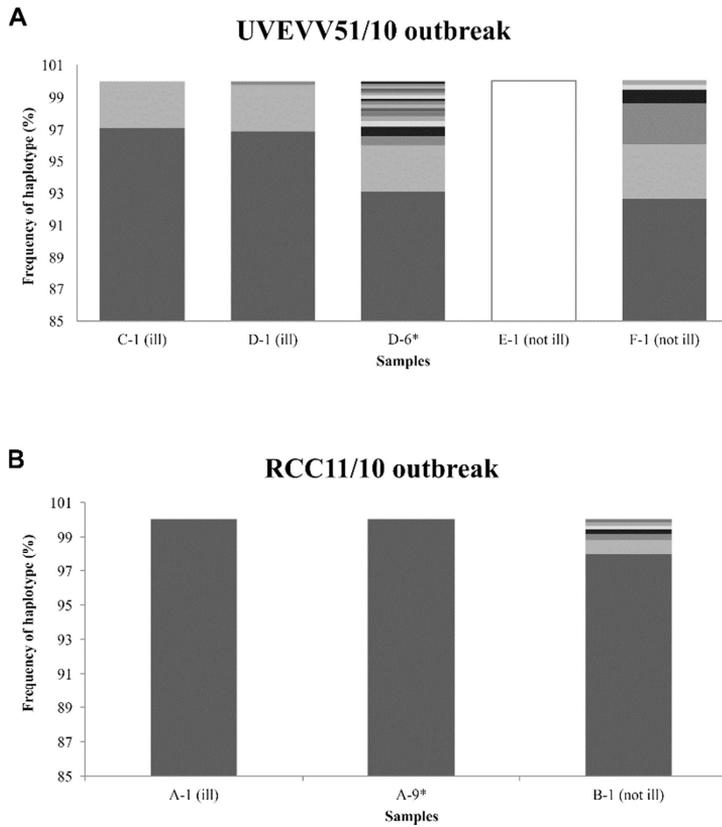


Fig 2. Comparison of the intra-host distribution of NoV haplotypes. Each unique haplotype is represented by alternate gray shading. **(A)** Subjects from RCC11/10 outbreak. **(B)** Subjects from UVEVV51/10 outbreak. Asterisk indicate serial sample.

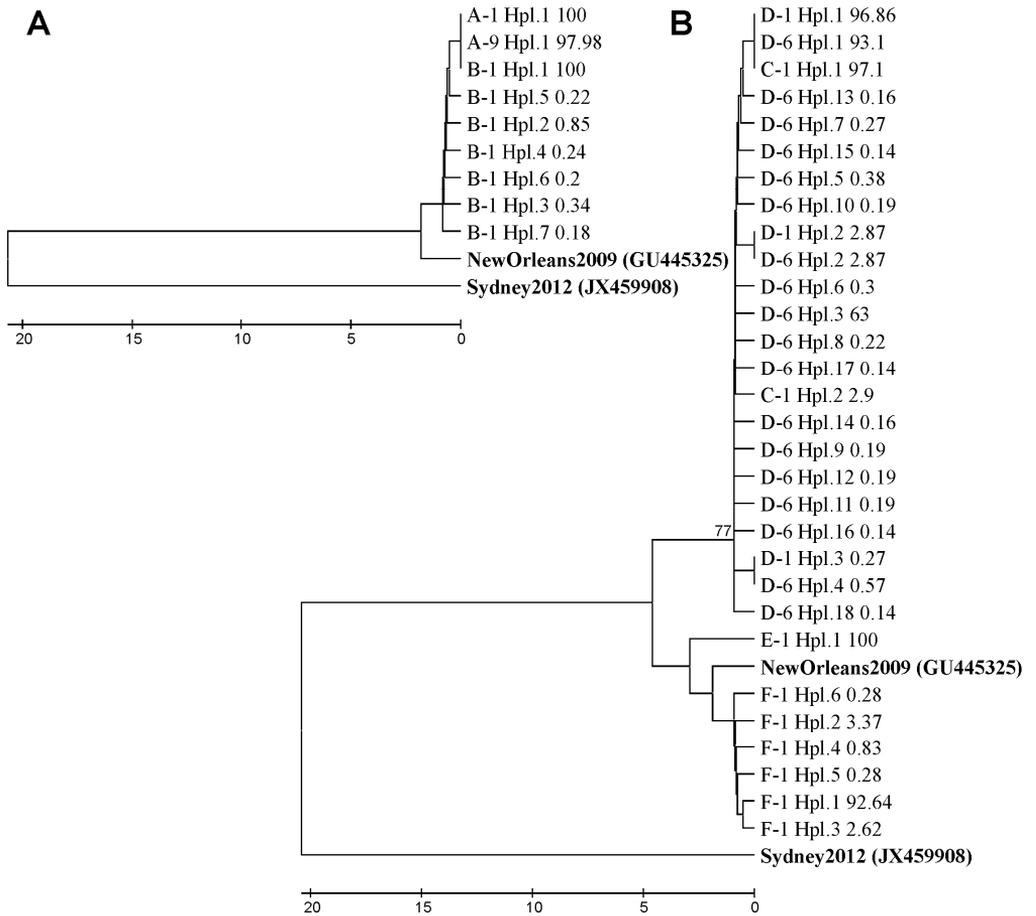


Fig 3. Phylogenetic analysis of haplotypes from RCC11/10 (A) and UVEVV51/10 (B) outbreak based on 450 pb of the P2 region. The nucleotide dendrogram was inferred using the UPGMA method with distance calculation by number of differences method using the MEGA7 software. A bootstrap of 1000 replicates was performed, and values above 75 are shown. Bold indicates reference strains. Haplotypes names are composed of sample name, number of haplotype.

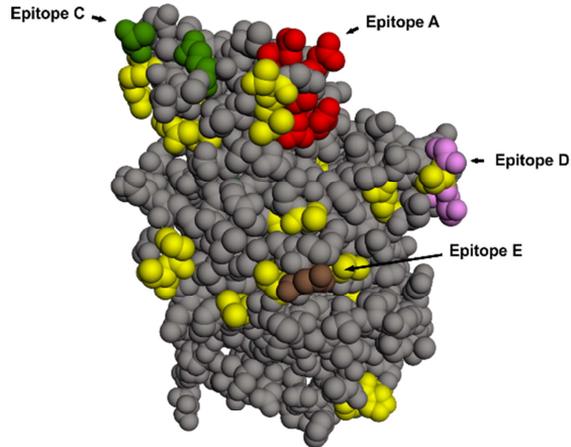


Fig 4. Amino acid variations in P domain. Amino acid changes observed in minor variants (yellow) were highlighted on the GII.4 P domain (side view), using the GII.4 2012 P2 domain structure (PDB id 4OOS; available at <https://www.rcsb.org/structure/4OOS>). The reference structure shows epitopes A (red), C (green), D (pink) and E (brown). The Jmol software was used to localize the amino acid residues (Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>).

Article IV: “Deep-sequencing characterization of an outbreak of hepatitis A in the men-having-sex-with men group: evidence for positive selection of antigenic variants”

Autors: Aurora Sabrià, Josep Gregori, Damir Garcia-Cehic, Susana Guix, Sandra Manzanares-Laya, Joan Caylà, Albert Bosch, Josep Quer, Rosa M. Pinto.

Els brots d’hepatitis A entre els homes que tenen sexe amb altres homes (MSM) estan augmentant en els últims anys a tot Europa degut a les pràctiques sexuals de risc. Des del 2016 hi ha un gran brot d’hepatitis A, genotip IA, amb 4000 afectats arreu d’Europa. Espanya és un dels països amb un elevat nombre de casos, però a Barcelona, gràcies a la implementació de la vacunació a finals del 1998, els afectats n’han sigut menys. No obstant, alguns d’ells havien estat vacunats prèviament. L’objectiu de l’estudi va ser analitzar la regió de la càpsida per veure la població viral en pacients vacunats i no vacunats, mitjançant la plataforma de NGS MiSeq d’Illumina.

Es van analitzar 26 mostres per a l’anàlisi filogenètic mitjançant la seqüència consens de la regió VP1/2A, i se’n van seleccionar 12 (de les quals 4 eren vacunats) per analitzar-les per NGS. Per fer-ho, es van dissenyar un conjunt de 10 fragments d’una mitjana de 437 pb que cobrien des de 5’NCR fins a 2A. I que estaven solapats entre ells entre 76 pb i 113 pb.

De les 26 mostres analitzades, el 73% estaven relacionades amb la soca VRD_521_2016, el 23% amb la RIVM-HAV16-090 i el 4% amb la V16-25801. Totes elles descrites en el brot MSM 2016 d’Europa.

Per a l’anàlisi de quasiespècies entre els vacunats i no-vacunats amb NGS, s’obtingué un total de 13394712 *reads* i s’exclogueren aquells haplotips amb abundàncies per sota el 0.5%. Es va observar alta diversitat a VP2 i VP1 en els individus vacunats i, no gaire a VP3. Les regions amb més diversitat corresponien als fragments F8 i F9, on es va trobar diferències significatives entre vacunats i no-vacunats a l’entropia de Shannon i a les freqüències de

mutació. En canvi, en el F5, que engloba part de VP3, els no-vacunats presentaven majors nivells de variabilitat. Els fragments F8 i F9 inclouen casi tota la VP1 que conté molts residus dels epítops de la càpsida d'HAV, suggerint una selecció positiva de les variants d'escapament en els pacients vacunats.

Dels 4 vacunats, dos es van classificar com a òpticament vacunats i els altres dos com a subòpticament vacunats a causa de les seves pautes de vacuna. Es van observar més mutacions no-sinònimes a VP1 en el grup dels vacunats, particularment en els subòpticament. El 7%, 39% i 54% de les mutacions en els vacunats i el 7%, 50% i 43% en els no-vacunats, es van donar a residus dels llocs antigènics, residus prop dels llocs antigènics i aleatòriament, respectivament. Es va observar però, força diferència en l'abundància de les variants ubicades directament o a prop dels llocs antigènics, on en dos dels vacunats van ser superiors del 5%. En general, el 40%, 23% i 37% de les mutacions en els no-vacunats i el 38%, 31% i 31% en els vacunats van ser directament o prop del lloc immunodominant de VP1, del lloc immunodominant de VP3 i del lloc d'unió a la glicoforina A, respectivament. Els haplotips amb mutacions a aquests 3 llocs, respectivament, representaren el 2.2%, 1.4%, i 1.5% en els no-vacunats i el 5.1%, 2.2%, i 3.3% en els vacunats. En total, els haplotips amb mutacions als epítops o al seu voltant fou del 5.1% en els no-vacunats i del 10.6% en els vacunats.

A més, es va veure que al llarg del temps la distribució de les mutacions va canviar, essent al final més freqüents al lloc d'unió a la glicoforina A.

Així doncs, es va trobar selecció positiva en el grup dels vacunats, on a més, la ratio Ka/Ks dels fragments F6, F7, F8 i F9 va ser significativament diferent. Vam observar també una diversitat significativament major en els fragments F6-F9 dels vacunats que no era deguda a la càrrega viral. Es va trobar correlació significativa entre la diversitat i la càrrega només en el grup dels vacunats.

Com alguns individus eren positius pel virus de la immunodeficiència humana (HIV), es va fer l'anàlisi comparatiru entre HIV+ i HIV- excloent els vacunats per descartar que els resultats no estiguessin esbiaixats i no es van trobar diferències. Curiosament, es va observar una càrrega més alta als HIV negatius. En conclusió, en el nostre estudi hem vist que hi ha una selecció positiva de variants antigèniques en pacients vacunats i això és un fet preocupant si s'acaben seleccionant. Cal evitar-ho al màxim i estudiar curosament l'impacte de les polítiques de vacunació al grup MSM per a garantir un alt nivell de seroconversió.

Deep-sequencing characterization of an outbreak of hepatitis A in the men-having-sex-with men group: evidence for positive selection of antigenic variants in vaccinated patients and implications for vaccination policy

Ms Aurora Sabrià^{1,*}, Dr Josep Gregori^{2,3,*}, Mr Damir Garcia-Cehic^{2,4}, Dr Susana Guix¹, Ms Sandra Manzanares-Laya^{5,6}, Dr Joan A. Caylà^{5,6}, Dr Albert Bosch¹, Dr Josep Quer^{2,4}, Dr Rosa M. Pintó¹

¹Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, and Institute of Nutrition and Food Safety, Campus Torribera, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²Liver Unit, Internal Medicine Hospital Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain.

³Roche Diagnostics, S.L., Sant Cugat del Vallés, Barcelona, Spain.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

⁵Epidemiology Service, Public Health Agency of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBEResp) del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

*Equally contributed

Correspondence to Prof. Rosa M. Pintó, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, School of Biology, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain. Tel: 34934034621. E-mail: rpinto@ub.edu, and Dr. Josep Quer, Vall d'Hebron Institut Recerca, Vall d'Hebron, 119-129 08035 Barcelona, Spain. Tel: 34934894034 E-mail: josep.quer@vhir.org.

Summary

Background A huge outbreak in the men-having-sex-with-men (MSM) has hit Europe during the years 2016-2018. Outbreak control has been hampered by vaccine shortages in many countries, and to minimize their impact, reduction of antigen doses has been implemented. However, these measures may have consequences on the evolution of hepatitis A virus (HAV), leading to the emergence of antigenic variants. Vaccine failures have been detected in MSM patients in Barcelona, opening the possibility to study HAV evolution under immune pressure.

Methods We performed deep-sequencing analysis of ten overlapping fragments covering the complete capsid coding region of HAV. A total of 13394712 reads were obtained and used for the analysis of virus evolution in vaccinated versus non-vaccinated patients. We estimated maximum and minimum mutation frequencies, and Shannon entropy in the quasispecies of each patient. Nonsynonymous mutations affecting residues exposed in the capsid surface were located, with respect to epitopes, using the recently described crystal structure of HAV, as an indication of its potential role in escaping to the effect of vaccines.

Findings HAV evolution at the quasispecies level, in non-vaccinated and vaccinated patients, revealed significantly higher diversity in epitope-coding regions of the vaccinated group. Although amino acid replacements occurring in and around the epitopes were observed in both groups, their abundance were significantly higher in the quasispecies of vaccinated patients, indicating ongoing processes of fixation.

Interpretation Our data suggest positive selection of antigenic variants in vaccinated patients, raising concern for new vaccination policies directed to the MSM group.

Interpretation Spanish Ministry of Economy grants BIO2014-53285-R, BIO2017-83191-R and PI16/00337, all co-financed by the European Regional Development Fund, Spanish Center for the Technological Development grant IDI-20151125, Carlos III-Health Institute Research Network on Hepatic and

Digestive Diseases-CIBERehd, and Generalitat de Catalunya Biotechnology Reference Network (XRB).

Introduction

The men-having-sex-with-men (MSM) group is a relevant target for hepatitis A due to risky practices that favour faecal-oral transmission. Several outbreaks affecting this group have recently occurred in Europe¹⁻⁵. Particularly relevant is the still ongoing outbreak which started in 2016 and has affected over 4000 patients across Europe. Three main circulating strains, belonging to genotype IA, have been detected: VRD_521_2016⁶, RIVM-HAV16-090⁷, and V16-25801⁸. The control of this outbreak has been hampered by low coverage vaccination in some countries, and by vaccine shortages, which have obliged decision-making administrations to implement some restrictions in the number of vaccine doses administered to patients and close contacts (<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-1; 05/23/2018>). However, while these measures attempt to avoid as much as possible the spread of the outbreak, and to protect the patients' health, their potential implications on hepatitis A virus (HAV) evolution should be a matter of debate, since the emergence of vaccine escape variants has been previously described⁹.

Despite the implementation of vaccine programs since 1999¹⁰, the 2016-2018 outbreak has affected the MSM group in Barcelona including some vaccinated patients. However, the incidence in Barcelona has been much lower than in other parts of Spain in which no regular vaccination campaigns exist. Next Generation Sequencing (NGS) of the capsid coding region is the best approach for the analysis of the HAV evolution in vaccinated and non-vaccinated patients, and to determine the best measures to avoid as much as possible the emergence of vaccine escape variants.

Methods

Study design and participants

The 2016-2018 hepatitis A outbreak in the MSM group in Barcelona affected a total of 159 patients at the end of 2017. Samples from 16.4% of these patients (n = 26) were available for analysis. Four out of these 26 samples belonged to vaccinated patients. Twelve samples were chosen for deep-sequencing including four from vaccinated patients, and eight additional samples from non-vaccinated patients. These eight samples were randomly chosen to cover the period of the outbreak.

All data related with the patients were recorded by the Public Health Agency of Barcelona and analyzed anonymously. Data were collected on a routine base, through the hepatitis A surveillance system of Barcelona, which gathers information from doctors, electronic notifications, and laboratory tests. The analyses were carried out retrospectively. Therefore, no informed consent was required because hepatitis A outbreaks are mandatory notifiable diseases. All data were treated in a strictly confidential manner according to the ethical principles of the Helsinki Declaration of 1964 revised by the World Medical Organization in Edinburgh, 2000 and the Organic Law 15/1999 of Data Protection in Spain.

Molecular procedures

RNA extraction from 150 µl of serum was performed by using the NucleoSpin RNA Virus kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions, and eluted in 50 µl. cDNA synthesis was performed using the SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA), using 5 µl of RNA and the primers described in Tables 1 and 2 of the web extra material. The cDNA length was of 352 nt and 3247 nt for genotyping and deep-sequencing, respectively.

Viral loads were determined as previously described¹¹, using five µl of the extracted RNA and the RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR

System (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), and were expressed as genome copies/ml of serum.

For genotyping, DNA amplification was performed by using the FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche Applied Science, Switzerland), with 10 μ l of cDNA and using the primers described in Table 1 of the web extra material. Consensus sequences were obtained using the ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) and the ABI Prism 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems). The reverse strand was sequenced and all mutations confirmed in the forward strand.

For deep-sequencing, DNA amplification was performed in two steps. In the first PCR, 10 μ l of cDNA were amplified using the FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche) and the primers described in Table 2 of the web extra material, to reach a single molecule covering the whole capsid coding region and a fragment of 2A (figure 1). Ten nested-PCRs were performed to amplify each of ten fragments, using the same kit but with 5 μ l of DNA from the first-round PCR as template. The average fragment size was 437-bp (minimum of 424-bp and maximum of 448-bp) with overlapping regions ranging from 76-bp to 113-bp (figure 1). Nested-PCR products were purified from agarose gel bands (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, CA, USA), quantified (Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen, ThermoFisher), and tested for quality (Bioanalyzer DNA 1000, Agilent, CA, USA). PCR products from a single patient were pooled at a normalized concentration and purified (Agentcourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, CA, USA). Another normalization was performed to 1.5 ng/ μ l, followed by the library preparation protocol using the Kapa HyperPrep Kit (Roche Applied Science, CA, USA), and the SeqCap Adapter Kit A/B (24 Index, Nimblegen, Roche) for the pool indexing. A second cleanup was performed (Kapa Pure Beads, KapaBiosystems, Roche) and a quality control assay was done using the Bioanalyzer. Each pool was normalized to 4nM, and appropriated volumes of each pool were added to the final library, which was quantified by LightCycler480 (Kapa Library Quantification Kit, KapaBiosystems, Roche). Last dilution of the Library was prepared and mixed with an internal DNA control

(PhiX control V3, Illumina, CA, USA) before been sequenced using the MiSeq platform with MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina).

Phylogenetic analysis

A phylogenetic analysis of a fragment of 255-bp (spanning positions 2956-3210) from the VP1/2A was performed with the neighbor-joining method (distance calculation by the Kimura-2-parameter correction; pairwise deletion) implemented in the MEGA7 program¹². Results were validated by 1000 bootstrap replicates. Genotype assignment was based on clustering with reference strains from the sequence database of the European Network (<https://www.rivm.nl/en/Topics/H/HAVNET>), and all sequences were deposited to GenBank with accession numbers MH476486 to MH476511.

Ultra-deep sequencing data management

A bioinformatic haplotype-centric procedure was used to exclude full reads that do not meet minimum quality requirements. Briefly, once acquiring raw data from MiSeq (fastq), the first step included the overlap of paired-end reads using FLASH (^{13,14}). The FLASH parameters were established as a minimum overlap between the paired-end reads, R1 and R2, of 20 bp with a maximum of 10% differences. Reads not fulfilling this requirement were discarded. Next, reads were demultiplexed by specific primers to obtain a fasta file by amplicon and strand. Reads were then collapsed into haplotypes with corresponding frequencies. Haplotypes were aligned with the reference sequence, and haplotypes containing more than two indeterminations, three gaps or 99 differences were also discarded. Accepted indeterminations and gaps were repaired as per the contents of the dominant haplotype. The intersection between forward and reverse haplotypes with abundances not below 0.1% was performed. Finally, all haplotypes with abundances below 0.5% were excluded.

The quasispecies complexity was analyzed by calculating the mutation frequencies and the Shannon entropy as previously described¹³. The synonymous mutations per synonymous site (K_s), and the nonsynonymous mutations per

nonsynonymous site (K_a) of the quasispecies were calculated using the DnaSP v6.0 software¹⁴ (<http://www.ub.es/dnasp/>).

Analysis of aa replacements on the surface of the HAV protomer, was performed using the coordinates from the crystal structure¹⁵ (RCSB accession code: 4QPI), and the Discovery Studio software (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, San Diego: Dassault Systèmes, 2016).

Statistical analysis

Statistical differences of the different parameters under analysis between the non-vaccinated and vaccinated groups, and the HIV-non-infected and HIV-infected groups of patients were determined using the Student t-test (unpaired) or the Mann-Whitney Rank Sum Test using the SigmaPlot version 11; p values <0.05 were considered statistically significant.

Results

The European outbreak affecting the men-having-sex-with-men (MSM) in the season 2016-2017 affected 159 patients in the city of Barcelona. The genotype of 26 isolates was determined, proving that 73%, 23%, and 4% of the strains were related with the above described strains VRD_521_2016, RIVM-HAV16-090, and V16-25801, respectively, and were also closely related to the strains isolated in a previous outbreak that occurred in 2008-09 in Barcelona in the MSM group (figure 2).

Six out of the 159 patients had been vaccinated (3.78% of all cases), and four of these samples (2.5% of all cases) were available for deep-sequencing analysis, along with eight additional samples from non-vaccinated patients (5% of all samples). Ten fragments (F1-F10) were amplified to cover the 5' non-coding-region (5'NCR), the complete capsid region, and a fragment of the 2A region (figure 1). A total of 13394712 reads were obtained and used for the analysis of virus evolution in vaccinated versus non-vaccinated patients. The informative content (IC) of each position, obtained using overlapping windows of ten amino

acid (aa) sliding every three aa in a multi-alignment of all the sequences from vaccinated versus non-vaccinated patients, revealed some regions with variability differences. Some regions of VP2 (F3, F4 and F5) and VP1 (F7, F8 and F9) were more variable in the vaccinated patients, while some in VP3 (F5, F6 and F7) showed a lower variability (figure 3). VP1 regions with higher variability in the vaccinated group (figure 3), also showed significant differences ($p < 0.05$) regarding entropy (S_n) and minimum and maximum mutation frequencies (Table 1). In contrast, fragment F5 showed higher variability in the non-vaccinated group (figure 3). These data suggested the occurrence of purifying selection on the protein region encoded in F5 fragment, and positive selection in protein regions encoded in fragments F8 and F9 in the vaccinated group; in fact, fragments F8 and F9 altogether include almost the entire VP1 protein which contains many residues of the epitopes of the HAV capsid.

To look deep inside these possibilities, we plotted the frequency of nonsynonymous mutations detected in the quasispecies of each patient, i.e. the frequency of single nonsynonymous variants (SNSynV), all along the capsid (figure 4). Depending on their vaccination status, patients were classified as non-vaccinated ($n=8$; black dots), optimally-vaccinated ($n=2$; blue crosses), and suboptimally-vaccinated ($n=2$; red crosses). Optimally-vaccinated refers to the administration of two doses of the paediatric dual TWINRIX HAV+HBV vaccine during the childhood (patient M5) or two doses of the adult dual TWINRIX HAV+HBV vaccine 2 years before the onset of the hepatitis A (patient M7). In contrast, the suboptimally-vaccinated patients had received a single dose of the adult dual TWINRIX HAV+HBV vaccine 15 months before the onset of the disease (patient M46), or two doses of the same vaccine during the incubation period (patient M6). The average number of non-synonymous mutations in the VP1 coding region in both vaccinated groups was clearly above the non-vaccinated group, particularly in the suboptimally-vaccinated-group (Table 2). Remarkably, both vaccinated groups showed higher proportions of SNSynV in VP1 at frequencies above 5%, particularly in the optimally vaccinated group (Table 2 and figure 4).

The analysis of mutations located on the surface of the HAV protomer¹⁵ revealed interesting findings (figure 4). Among the non-vaccinated patients, 7% of the aa replacements involved residues from antigenic sites, 39% involved residues closely located to these sites, and 54% were randomly distributed. Similarly, in the vaccinated patients, 7% and 50% of the replacements were in or closely located to the antigenic sites, respectively, and 43% were randomly distributed on the surface of the protomer. However, the most striking difference was the abundance of the mutations located in or near the antigenic sites in the quasispecies. While in the non-vaccinated patients these variants were found at frequencies below 5%, in the vaccinated patients some replacements were much more abundant, again indicating the action of positive selection. Of note, patient M5 bore the replacements Arg to Ser at position 138 of VP1 (close to the glycoprotein A binding site epitope; encoded in a genome region included in fragments F8 and F9), and Asn to Ile at position 67 of VP3 (close to the VP3 immunodominant site; included in fragment F6), at frequencies of 9.5% and 5.9%, respectively; additionally, patient M6 bore the replacement Leu to Ser at position 243 of VP1 (close to the VP1 immunodominant site; included in fragment F9) at a frequency of 12.7% (figure 4). In contrast, vaccinated patients M7 and M46 showed the same abundance of antigenic variants than non-vaccinated patients. Overall, 40%, 23%, and 37% of the replacements located in and around the antigenic sites in the quasispecies of the non-vaccinated group and 38%, 31%, and 31% in the vaccinated group, were in the VP1 immunodominant site, the VP3 immunodominant site, and the glycoprotein A binding site epitope, respectively. More remarkably, haplotypes bearing mutations in and around the VP1 and the VP3 immunodominant sites, and the glycoprotein A binding site epitope represented 2.2%, 1.4%, and 1.5%, and 5.1%, 2.2%, and 3.3% in the non-vaccinated and vaccinated groups, respectively. Altogether, in the non-vaccinated and vaccinated patients the proportion of haplotypes bearing mutations in and around the epitopes were of 5.1% (0.6%-11.6%) and 10.6% (4%-20%), respectively. Additionally, the distribution of mutations in the three sites changed over time with preponderance around the VP1 dominant site at the beginning of the outbreak, and a dominance around the glycoprotein A binding site epitope towards the end (figure 5). The protein encoded in F5 fragment

contains many of the residues of the VP3 immunodominant region, whose replacements are increased in the vaccinated patients, thus, the potential purifying selection of mutations emerging in this genome fragment in the vaccinated patients could be related to some negative epistatic effects increasing the exposure of epitopes.

Altogether, the analysis of the genomic features and the location of mutations on the protomer surface, suggested positive selection of replacements in fragments F6, F7, F8, and F9 in the vaccinated group. In fact, the ratio of non-synonymous to synonymous variants (K_a/K_s) of these fragments was significantly ($p < 0.001$) higher in the vaccinated group ($K_a/K_s = 0.87 \pm 0.86$) than in the non-vaccinated group ($K_a/K_s = 0.57 \pm 0.72$). In contrast, no differences were found in the K_a/K_s of fragments F3, F4, and F5 (0.47 ± 0.58 in the vaccinated group vs 0.52 ± 0.60 in the non-vaccinated group). Additionally, when we looked at the total number of haplotypes bearing aa replacements (as a measure of diversity) in the F6-F9 group of fragments, we found a significantly higher diversity ($p < 0.02$) in the vaccinated group, which was not due to a higher virus titre (figure 6). Interestingly, the diversity in the vaccinated group significantly correlated ($R^2 = 0.90$; $p < 0.05$) with the genome titre of the patients, while no correlation was found in the non-vaccinated group.

Since 42% of the patients were HIV-infected (M1, M4, and M17 in the non-vaccinated group and M7 and M47 in the vaccinated group), we tested whether some of the conclusions may be biased by the HIV status. Hence, we compared the diversity of haplotypes with aa replacements and the HAV genome load in sera between the HIV-non-infected and the HIV-infected groups, excluding the vaccinated patients, and no significant differences were found (figure 7).

Discussion

In the current scenario of hepatitis A vaccine shortage, several countries have implemented as a first measure the reduction of the number of vaccine doses and the antigen content of the doses (<https://www.ecdc.europa.eu/en/news->

[events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-1; 05/23/2018](#)). Public Health England recommendations for the vaccination of the MSM group in shortage settings, are among the most rational, and based on the following criteria. For immunocompetent adults under 60 years of age, a single dose of vaccine with half the adult antigen content may be enough since its immunogenicity, at one month, is equivalent to the complete antigen content. For patients immunocompromised, with chronic liver disease or aged over 60 years, due to a lower and slower response to vaccine, a higher antigen content dose is required (https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/626228/Hepatitis_A_vaccination_recommendations.pdf; [05/23/2018](#)). Recommendations from the Spanish Health System (http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunacion/docs/Problemas_suministro_HepatitisA.pdf; [05/23/2018](#)) and the Health Department of Catalonia (http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut_responsiu/salutAZ/V/vacunacions/documents/guia_desabastiment_07032017.pdf; [05/23/2018](#)) are less comprehensive and based on the administration of a single dose and two doses in the immunocompetent and the immunocompromised patients, respectively. However, despite the need to preserve the vaccine stocks, the implications that the reduction of the overall antigen administered may have on virus evolution and the potential emergence of variants escaping vaccine protection are mostly unknown¹⁶. Although HAV is an antigenically stable virus due to genetic and structural constraints¹⁷, immune pressure selection may force the emergence of such variants and even of a new serotype.

In this study, we have analysed the evolution of HAV in four cases of vaccine failures in comparison to the evolution in non-vaccinated patients. As expected, mutations located in or close to the capsid antigenic sites were found in both, vaccinated and non-vaccinated patients, and may be explained by the higher tolerance to mutation of the exposed capsid regions, or to the hitchhiking of replacements at antigenic sites belonging to genomes selected for other traits or by genetic drift^{18,19}. However, the significantly higher K_d/K_s of the epitope

containing fragments, and the higher diversity of haplotypes harbouring aa replacements, combined with the higher proportion of antigenic variants in the quasispecies, suggest positive selection of these variants in the vaccinated patients.

The cause of these vaccine failures is intriguing. HAV vaccination is estimated to provide immunity up to twenty years in the general population²⁰, and at least up to ten years in the HIV-infected patients with high seropositivity rates²¹. Two failures were observed in optimally-vaccinated patients. The first patient received two doses of the dual paediatric TWINRIX vaccine during his childhood (M5), was 34-year old and HIV-non-infected, and showed a moderate diversity of antigenic variants but otherwise representing 20% of the virus population, and likely towards fixation of at least two mutations. The time lapse since the vaccination was over twenty years, and this could have caused a reduction of the antibody titres, allowing the virus to replicate in the presence of antibodies, and hence facilitating the selection of escaping variants. The second patient received two doses of the dual adult TWINRIX vaccine two years before the onset of hepatitis A (M7), was 28-year old and immunocompetent HIV-infected, and showed a moderate diversity of antigenic variants but none of them at a high proportion. The other two failures were in suboptimally-vaccinated patients. The first patient received a single dose of the adult dual TWINRIX vaccine 15 months before the onset of the disease (M46), was an immunocompetent HIV-infected 24-year old man, and again showed a moderate diversity of antigenic variants with none at high proportion. Vaccine failures after a single dose have been previously described but data on virus evolution has never been discussed²². The second patient, that received two doses of the adult dual TWINRIX vaccine during the incubation period (M6), was 34-year old and HIV-non-infected, and showed a moderate diversity of antigenic variants but with one, affecting the immunodominant site, at a proportion of 12.7%, again suggesting an ongoing process of fixation. Post-exposure vaccination is increasingly being used to prevent cases among contacts, and although is a good preventive measure, failure rates of 4.4%-6.9% have been described^{23,24}. HAV replication takes place mostly during the incubation time of the disease and again the low concentration of

antibodies would have allowed the virus to replicate in their presence enabling the selection of escaping variants. Regarding the two vaccine failures in HIV-infected patients, with a repertoire/proportion of HAV antigenic variants similar to that of the non-vaccinated patients, the failure could be due to a lack of response to the vaccine as previously described²⁵. Alternatively, it could be due to a less prone antigenic variant emergence, since HIV-infected patients showed a tendency to carry a lower HAV genome load. This tendency contrasts with the data available in the literature showing average genome loads of 10^3 - 10^7 and of 10^7 - 10^8 genome copies/ml of sera in HIV-non-infected patients^{26,27} and HIV-infected patients^{11,28}, respectively. Whether this change in the HAV replication capacity observed in HIV-infected patients is related to the recent introduction of new antivirals in the anti-HIV therapy remains unknown.

Antigenic variants arising around the immunodominant site epitopes usually show lower *in vitro* fitness in the absence of antibodies than the wild-type virus¹⁹, and in fact natural variants from this site, previously isolated in the MSM 2008-09 outbreak circulated in the population for a short period of time²⁹. However, variants from the glycoprotein A binding site epitope, which tended to prevail at the end of the study, show the same *in vitro* fitness than the wild-type strains¹⁹, and thus represent a public health threat.

The MSM group is becoming endemic for hepatitis A requiring specific vaccination policies. From this study, some recommendations aiming to avoid the emergence of vaccine escape variants can be anticipated: booster doses should be administered to those vaccinated long time ago or with low anti-HAV antibodies, and vaccine post-exposure prophylaxis should be reconsidered.

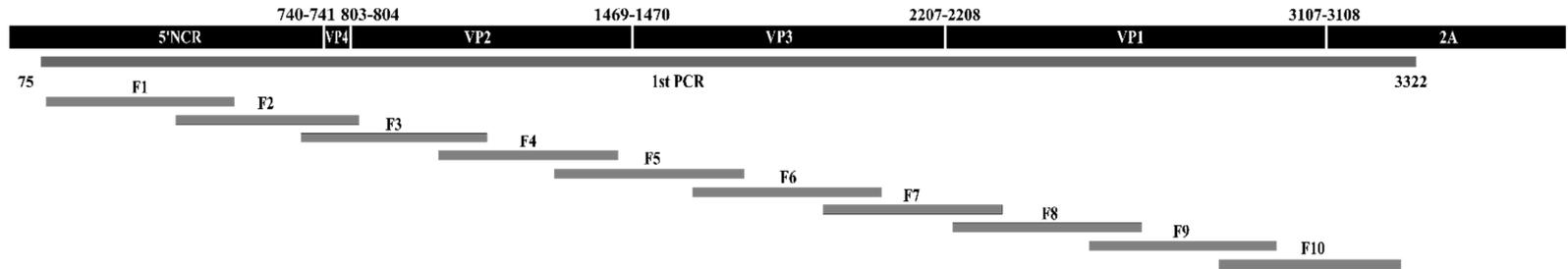


Figure 1. Diagram of the fragments used for the deep-sequencing analysis covering, the 5' non-coding-region (5'NCR), the complete capsid region (VP4, VP2, VP3, and VP1), and a fragment of the 2A region.

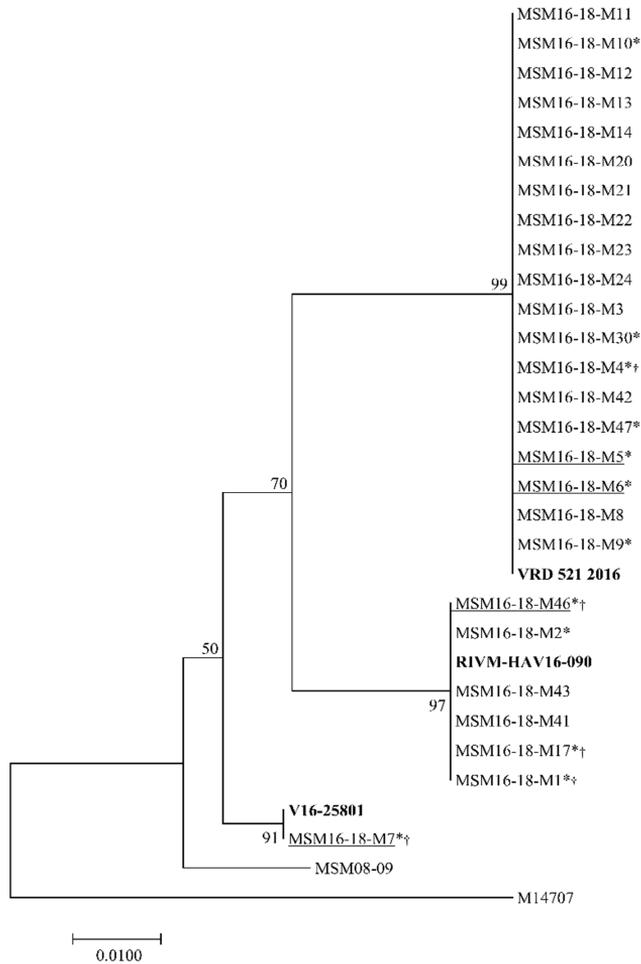


Figure 2. Phylogenetic analysis of HAV strains isolated from patients of the men-having-sex-with-men (MSM) 2016-2018 outbreak from Barcelona. Phylogenetic tree is based on a 255-bp (spanning positions 2933-3211) from the VP1/2A protein. The nucleotide dendrogram was constructed using the neighbour-joining method with distance calculation by the Kimura-2-parameter, and performing a bootstrap of 1000 replicates. Samples from vaccinated individuals (n=4) are underlined, samples from HIV-infected patients (n=5) are indicated with the “†” symbol. Samples further analysed by MiSeq Illumina (n=12) are indicated with “*”. The three main circulating strains in Europe related to this outbreak, VRD_521_20166, RIVM-HAV16-0907, and V16-258018A are included, and labelled in bold, as well as a representative sample from a previous MSM outbreak in Barcelona from 2008-09. All samples were obtained in the period 2016-2017.

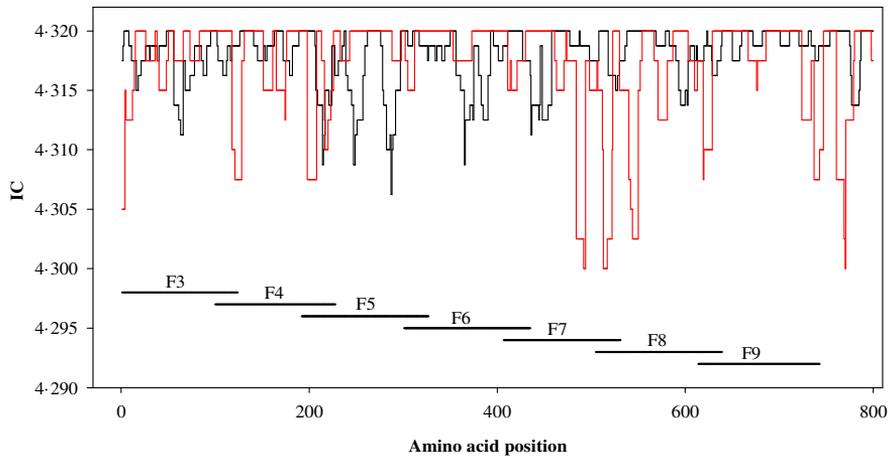


Figure 3. Informative content (IC) of each amino acid position along the region under study (complete capsid). The analysis was performed using overlapping windows of 10 aa sliding every 3 aa. Each point (aa position) corresponds to the mean IC (in bits) from all the sequences of a given group. The black line corresponds to the non-vaccinated group and the red line to the vaccinated group. Values have been normalized by the frequency of each substitution and the number of sequences per group.

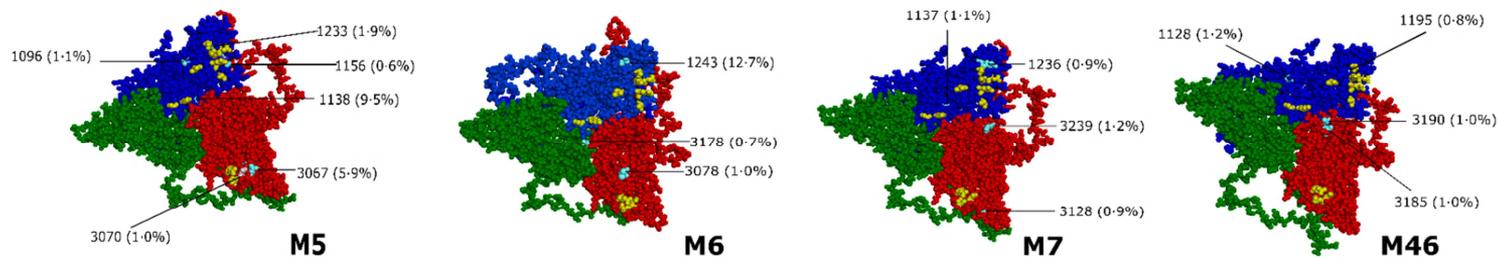
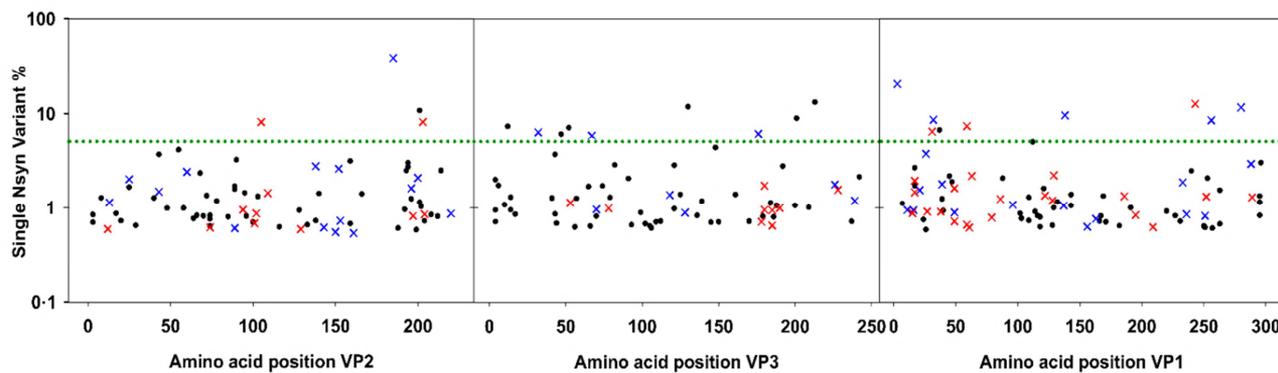
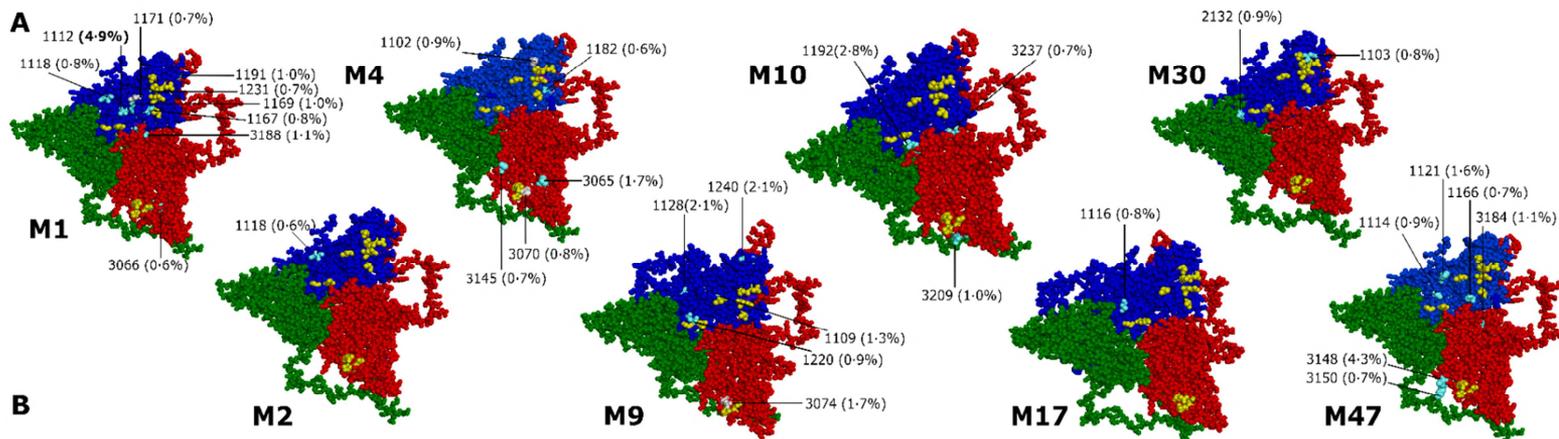


Figure 4. Analysis of the single non-synonymous variants (SNSynV) along the capsid region and location of the variants affecting residues in and around the antigenic sites of the HAV capsid. (A) Protomers from non-vaccinated patients (M1, M2, M4, M9, M10, M17, M30, and M47). (B) Frequency (%) of SNSynV detected in the non-vaccinated patients (n=8; black dots), optimally-vaccinated patients (n=2; blue crosses) and suboptimally-vaccinated patients (n=2; red crosses); black dots are more common due to the higher n. The horizontal green line represents the 5% frequency; points over this line represent high-frequency mutations. (C) Protomers from vaccinated patients (M5, M6, M7, and M46). (A and C) Green protein corresponds to VP2, red to VP3 and blue to VP1. Grey residues represent mutations in the epitopes. Clear blue residues represent mutations close to the epitopes. The immunodominant site is formed by epitopes from VP1 (yellow residues in its right side) and an epitope in VP3 (yellow residues in it). The glycoporphin A binding site epitope is in VP1 (yellow residues in its bottom centre). Protomers used to locate the replacements were extracted from the recently resolved crystal structure of HAV¹⁵.

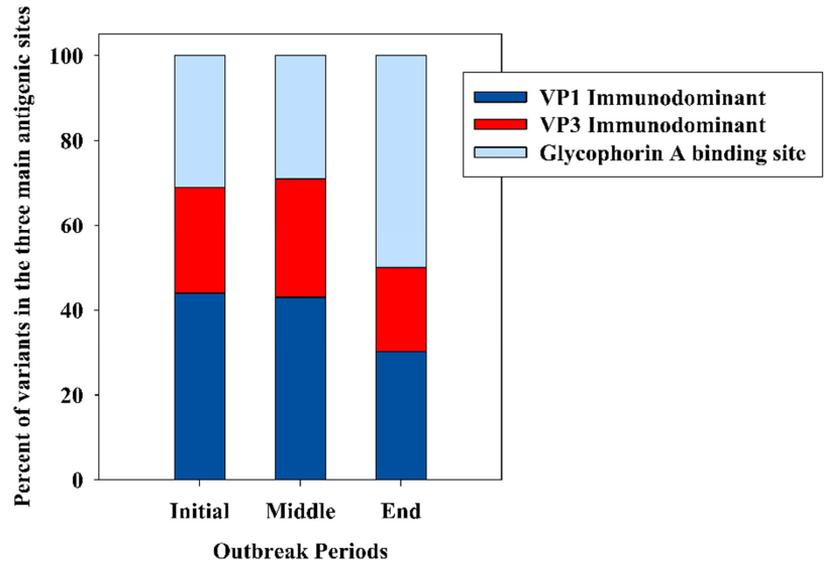


Figure 5. Percent of mutations located in and around the VP1 immunodominant site (dark blue), the VP3 immunodominant site (red) and the glycophorin A binding site epitope (clear blue) across time.

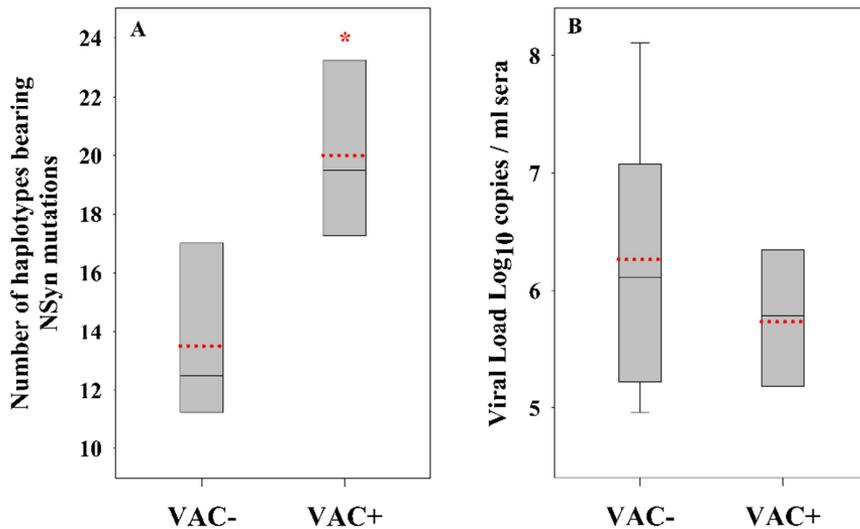


Figure 6. Diversity of haplotypes bearing amino acid replacements in the genome region including most of the residues involved in the antigenic sites of the HAV capsid, and comparison with virus load in non-vaccinated and vaccinated patients. (A) Boxplot of the total number of haplotypes in the coding region included in fragments F6, F7, F8 and F9 as a measure of the diversity associated to a positive immune selection. (B) Boxplot of the average virus load in sera from the non-vaccinated and vaccinated groups. Bottom and upper limits of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively. When present ($n > 9$), bottom and upper whiskers represent 10th and 90th percentiles, respectively. *Significant differences ($p < 0.05$).

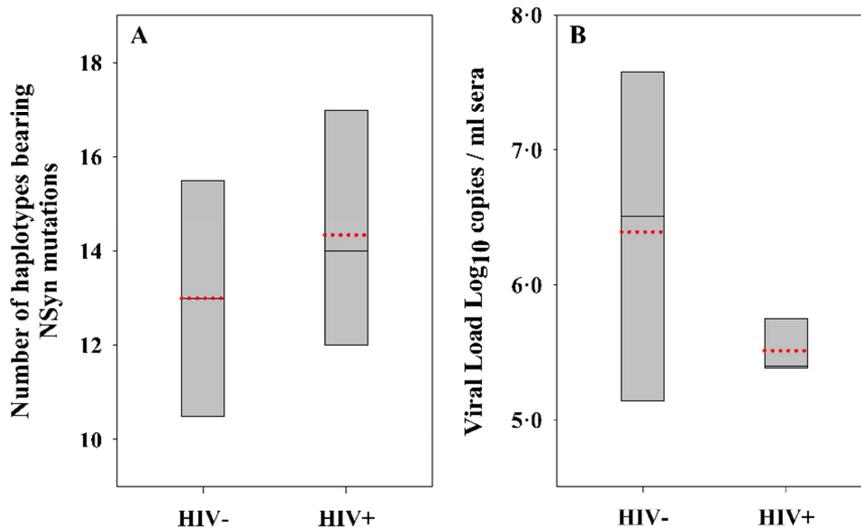


Figure 7. Diversity of haplotypes bearing amino acid replacements in the genome region including most of the residues involved in the antigenic sites of the HAV capsid and comparison with virus load in HIV-non-infected and HIV-infected patients. (A) Boxplot of the total number of haplotypes in the coding region included in fragments F6, F7, F8, and F9 as a measure of the diversity associated to a positive immune selection. (B) Boxplot of the average virus load in sera from HIV-non-infected and HIV-infected groups. The bottom and upper limits of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively. The median is represented by a solid black line and the average as a dotted red line. *Significant differences ($p < 0.05$).

Table 1. Genomic characterization of the quasispecies of the complete capsid coding region and part of 2A from vaccinated (n=4) versus non-vaccinated patients (n=8). Bold figures represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between the non-vaccinated and vaccinated groups. F1 correspond to a non-coding region and F2 includes a very small coding region, hence amino acid-related cells are empty.

Fragment	Shannon entropy (Mean± SD)		Nucleotide Mutation Frequency (Mean± SD)		Amino acid Mutation Frequency (Mean± SD)		
	Nucleotide	Amino acid	Minimum ($\times 10^{-7}$)	Maximum ($\times 10^{-4}$)	Minimum ($\times 10^{-7}$)	Maximum ($\times 10^{-4}$)	
VAC-	F1	0.03 ± 0.02		2.54 ± 3.06	2.71 ± 1.98		
	F2	0.03 ± 0.02		1.17 ± 1.06	2.66 ± 2.26		
	F3	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.04	5.01 ± 4.16	2.73 ± 2.16	45.0 ± 63.1	22.0 ± 29.5
	F4	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.06	4.10 ± 3.67	2.32 ± 2.15	5.44 ± 5.63	2.82 ± 3.79
	F5	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	6.94 ± 6.72	3.60 ± 1.78	8.85 ± 7.49	6.55 ± 4.54
	F6	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	1.99 ± 2.25	3.40 ± 2.67	2.82 ± 2.62	4.98 ± 6.04
	F7	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	2.21 ± 2.17	2.64 ± 1.14	2.52 ± 3.14	4.23 ± 3.96
	F8	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	1.72 ± 0.95	1.83 ± 1.42	3.33 ± 2.54	3.14 ± 3.25
	F9	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	1.14 ± 0.91	1.13 ± 6.50	1.63 ± 1.96	1.23 ± 1.30
	F10	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.02	1.84 ± 2.18	3.28 ± 2.95	3.31 ± 3.73	7.57 ± 9.50
VAC+	F1	0.05 ± 0.03		5.77 ± 6.18	3.71 ± 2.09		
	F2	0.04 ± 0.03		1.56 ± 1.46	2.59 ± 2.60		
	F3	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01	4.86 ± 1.96	3.62 ± 2.58	7.64 ± 2.64	20.4 ± 34.6
	F4	0.09 ± 0.05	0.03 ± 0.03	4.41 ± 3.53	9.16 ± 6.73	7.23 ± 5.85	14.0 ± 15.6
	F5	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	1.16 ± 0.82	2.00 ± 1.01	1.25 ± 1.93	0.82 ± 0.98
	F6	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.02	2.26 ± 1.28	3.68 ± 4.28	4.52 ± 3.91	3.67 ± 4.67
	F7	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	2.75 ± 2.61	3.74 ± 2.23	4.72 ± 5.77	9.12 ± 6.71
	F8	0.07 ± 0.03	0.04 ± 0.01	2.07 ± 2.17	5.78 ± 3.55	4.27 ± 4.69	10.3 ± 2.80
	F9	0.07 ± 0.04	0.02 ± 0.01	3.48 ± 2.55	4.93 ± 3.45	4.69 ± 3.27	6.32 ± 5.38
	F10	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.02	3.16 ± 3.85	4.14 ± 1.11	6.86 ± 10.4	7.51 ± 6.54

Table 2. Analysis of the single non-synonymous variants (SNSynV) detected in the complete capsid coding region. Data represents the average number of non-synonymous mutations per patient. In brackets appears the proportion of these mutations present at frequencies above 5%.

	VP2	VP3	VP1
Non-Vaccinated	6·26 (0·02)	6·63 (0·11)	5·75 (0·02)
Optimally-Vaccinated	7·50 (0·06)	3·50 (0·43)	9·50 (0·26)
Suboptimally-Vaccinated	5·50 (0·18)	4·50 (0·00)	11·50 (0·13)

Contributors

RMP, JQ, and AB conceived the idea and designed the study. AS and DG performed the experimental work. AS, RMP, JG, JQ, AB, and SG analysed the data. SM and JAC provided epidemiological data and analysis. RMP, AS, and AB wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

References

1. Corey L, Holmes KK. Sexual transmission of hepatitis A in homosexual men: incidence and mechanism. *N Engl J Med* 1980; **302**: 435-8.
2. Christenson B, Brostrom C, Bottiger M, et al. An epidemic outbreak of hepatitis A among homosexual men in Stockholm. Hepatitis A, a special hazard for the male homosexual subpopulation in Sweden. *Am J Epidemiol* 1982; **116**: 599-607.
3. Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol* 2007; **79**: 356-65.
4. Urbanus AT, van Houdt R, van de Laar TJ, et al. Viral hepatitis among men who have sex with men, epidemiology and public health consequences. *Euro Surveill* 2009; **14**: pii= 19421.
5. Tortajada C, de Olalla P, Díez E, et al. Hepatitis a among men who have sex with men in Barcelona, 1989-2010: insufficient control and need for new approaches. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 11.
6. Beebejaun K, Degala S, Balogun K, et al. Outbreak of hepatitis A associated with men who have sex with men (MSM), England, July 2016 to January 2017. *Euro Surveill* 2017; **22**: pii=30454.
7. Freidl GS, Sonder GJ, Bovee LP, et al. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Euro Surveill* 2017; **22**: pii=30468.
8. Werber D, Michaelis K, Hausner M, et al. Ongoing outbreaks of hepatitis A among men who have sex with men (MSM), Berlin, November 2016 to January 2017 - linked to other German cities and European countries. *Euro Surveill* 2017; **22**: pii=30457.

9. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, et al. Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 734-8.
10. Godoy P, Carmona G, Manzanares S, et al. Trends and risk factors of hepatitis A in Catalonia after the introduction of a hepatitis A+B vaccination programme. *J Viral Hepat* 2018. [Epub ahead of print].
11. Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 3846-55.
12. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; **33**: 1870-4.
13. Gregori J, Perales C, Rodríguez-Frias F, et al. Viral quasispecies complexity measures. *Virology* 2016; **493**: 227-37.
14. Rozas J, Rozas R. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Comput Appl Biosci* 1995; **11**: 621-5.
15. Wang X, Ren J, Gao Q, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* 2015; **517**: 85-8.
16. Pintó RM, D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, et al. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol* 2012; **7**: 331-46.
17. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, et al. Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018. pii: a031781. [Epub ahead of print].
18. Sánchez G, Bosch A, Gómez-Mariano G, et al. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 2003; **315**: 34-42.
19. Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A Virus Mutant Spectra under the Selective Pressure of Monoclonal Antibodies: Codon Usage Constraints Limit Capsid Variability. *J Virol* 2008; **82**: 1688-700.
20. Clemens R, Safary A, Hepburn A, et al. Clinical experience with an inactivated hepatitis A vaccine. *J Infect Dis* 1995; **171 Suppl 1**: S44-9.

21. Crum-Cianflone NF, Wilkins K, Lee AW, et al. Long-term durability of immune responses after hepatitis A vaccination among HIV-infected adults. *J Infect Dis* 2011; **203**: 1815-23.
22. Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P, et al. Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* 1994; **271**: 1328-34.
23. Victor JC, Monto AS, Surdina TY, et al. Hepatitis A vaccine versus immune globulin for postexposure prophylaxis. *N Engl J Med* 2007; **357**: 1685-94.
24. Whelan J, Sonder GJ, Bovee L, et al. Evaluation of hepatitis A vaccine in post-exposure prophylaxis, The Netherlands, 2004-2012. *PLoS One* 2013; **8**: e78914.
25. Mor Z, Lurie Y, Katchman E. A case of hepatitis A vaccination failure in an HIV-positive man who had sex with men in Israel. *Int J STD AIDS* 2012; **23**: 529-30.
26. Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, et al. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat* 2002; **9**: 101-6.
27. Normann A, Jung C, Vallbracht A, et al. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol* 2004; **72**: 10-6.
28. Costa-Mattioli M, Allavena C, Poirier AS, et al. Prolonged hepatitis A infection in an HIV-1 seropositive patient. *J Med Virol* 2002; **68**: 7-11.
29. D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, et al. Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 6842-54.

Table 1 web extra material. Primers used for genotyping

Primer	Sequence (5'-3')	Polarity	Region	Location^a
RT				
HAV3	TTCATTATTTTCATGCTCCTC	-	2A	3267-3286
PCR				
HAV5	TTGTCTTTTAGTTGTTATTTGTC	+	VP1	2934-2955
HAV3	TTCATTATTTTCATGCTCCTC	-	2A	3267-3286

^aNucleotide position according to strain HM175 (GenBank accession number M14707).

Table 2 web extra material. Primers designed for deep-sequencing.

Primer	Sequence (5'-3')	Polarity	Region	Location^a
RT				
Fr.10RvLL	GCYCTRGATCWGCWGTNAYWCC	-	2A	3300-3322
First PCR				
Fr.1FwLL	CGTTTGCCTAGGCTATRGG	+	5' NCR	75-94
Fr.10RvLL	GCYCTRGATCWGCWGTNAYWCC	-	2A	3300-3322
Nested PCR				
Fr1.Fw	CTATRGGCTAWWYYTYCCYTTYTC	+	5' NCR	87-110
Fr1.Rv	ATGCATCCACTGGATGAG	-	5' NCR	516-533
Fr2.Fw	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	+	5' NCR	393-411
Fr2.Rv	AATCATYTYGYTCYTCCTC	-	VP2	810-827
Fr3.Fw	GAGGTACTCAGGGGCATTTAG	+	5' NCR	690-710
Fr3.Rv	TCAATKCCAAATCTTGCATAWG	-	VP2	1108-1129
Fr4.Fw	ACACATGCTYTBTTYCATG	+	VP2	1014-1032
Fr4.Rv	TCYAARTCWGTAAAYCTAGC	-	VP2	1419-1438
Fr5.Fw	CCWTTYATTTAYACWAGRGG	+	VP2	1287-1306
Fr5.Rv	GTCATYTGGAARAARTATGG	-	VP3	1716-1735
Fr6.Fw	ACHCAYTTYACWACYTGGAC	+	VP3	1614-1633
Fr6.Rv	AGTRTACTCWCCYTTYTGRTG	-	VP3	2040-2060
Fr7.Fw	ARGCMACYACTGDCCTTGTGC	+	VP3	1921-1942
Fr7.Rv	TGBACRCCYGAHAYRTCC	-	VP1	2327-2345
Fr8.Fw	GHTTYTCHACMACWGTTTC	+	VP3	2227-2245
Fr8.Rv	ATDCCATCHACATCAGTDGCYC	-	VP1	2652-2674
Fr9.Fw	TCDACHTCYAAYCCYCCWCATGG	+	VP1	2550-2572
Fr9.Rv	AAATARAACCTCWGAYTYGTC	-	VP1	2964-2983
Fr10.Fw	GGYYTKGGWGAYAARACWGATTC	+	VP1	2856-2878
Fr10.Rv	TTCATYATTTTCATGVTCYTC	-	VP1	3267-3286

^aNucleotide position according to strain HM175 (GenBank accession number M14707).

Research in context

Evidence before this study

We searched PubMed using the search terms “hepatitis A” and “MSM”. Since 1998, there has been an increase of outbreaks of hepatitis A in the men-having-sex-with-men (MSM), with a tendency over time to be larger and globally widespread. Hence, it is evident that the MSM group is an endemic at-risk group for hepatitis A. A second search with the terms “hepatitis A” and “vaccine failure” was also done, rendering very few report cases, indicating that the hepatitis A vaccine is highly efficient. However, these failures are always assumed to be due to a lack of seroconversion and never to the emergence of vaccine-escape variants. Nevertheless, a previous study from our group described the occurrence of such variants in an outbreak in the MSM group in Barcelona in 2008.

Currently, there is a problem of hepatitis A vaccine shortages, that has required Public Health Agencies worldwide to implement changes in the vaccination schedules to reduce the antigenic doses. The advent of the next generation sequencing techniques (NGS), brings the possibility to deep-sequence serum samples from non-vaccinated, optimally-vaccinated and suboptimally-vaccinated patients, with the aim to seek for the emergence of antigenic variants.

Added value of this study

Our results represent the first ever-made analysis of the evolution of HAV in vaccinated versus non-vaccinated patients. This study has revealed that, due to the quasispecies dynamics of HAV, the emergence of antigenic variants in an around the main epitopes of the capsid occurs in both, vaccinated and non-vaccinated patients. However, only in vaccinated patients these variants increase in number suggesting their positive selection. Particularly, provided these antigenic variants had a high fitness, their circulation in the MSM group may rapidly increase, and further expand to the general population.

Implications of all the available evidence

Emergence of HAV antigenic variants may become a public health threat and have consequences in the future usefulness of the presently available vaccines. To avoid as

much as possible their selection, careful and systematic studies on the impact of the new vaccination policies directed to the MSM group are required, to ensure not only a high percent of seroconversion but also a high level of seroconversion. Some measures may include the administration of booster doses to vaccinees with low anti-HAV antibodies, and to avoid the vaccine post-exposure as a prophylaxis.

DISCUSSIÓ

Dos dels virus entèrics humans més rellevants en l'àmbit de la salut pública i la seguretat alimentària són els HuNoV, causants de gastroenteritis aguda (GEA) esporàdica i epidèmica, i l'HAV, la principal causa de hepatitis aguda a nivell mundial. Els HuNoVs afecten a tots els grups d'edat, la seva distribució geogràfica és mundial, i estudis a nivell Europeu indiquen incidències d'entre 380-470 casos per cada 10,000 habitants [222]. En quant HAV, la infecció sol ser asimptomàtica en nens i la gravetat augmenta amb l'edat, i Europa es considera una regió de baixa endemicitat amb incidències d'entre 2-19 casos per cada 100,000 habitants [223].

En aquest context, la tesi s'ha iniciat amb l'estudi i la caracterització de l'epidemiologia clínica i molecular dels brots de GEA provocats per HuNoV a Catalunya en un període de tres anys.

La vigilància de brots de GEA provocats per HuNoV a Catalunya no es realitza sistemàticament. La incidència i característiques epidemiològiques i clíniques dels brots per HuNoV a Espanya està ben documentada [224][225][226][227][228] [229][230], però a Catalunya la informació de soques circulants no s'ha actualitzat des del 2006. L'estudi més recent de la diversitat de soques de HuNoV que circula a Catalunya s'ha fet al nostre grup però no en la clínica sinó a nivell ambiental [231], i els estudis en clínica estan enfocats en brots en concret, com el cas d'un brot al gener del 2010 que tingué lloc a una escola de Lleida [232].

En brots de toxiinfecció alimentària per HuNoV s'ha identificat el manipulador de l'aliment com a causa principal, essent una higiene deficient de les mans la principal ruta de contaminació viral [118][120][233]. Cal tenir en compte que l'excreció dels virus comença abans de manifestar-se els símptomes i continua després que desapareguin, sumant que s'han detectat individus que són asimptomàtics durant tot el període d'infecció però excreten tants virus com una persona malalta. S'estima que aquestes infeccions asimptomàtiques

ocorren aproximadament en un terç dels individus infectats [234][235] i ja des de l'any 2000 Daniels *et al.* [236] van ser els primers en demostrar la implicació d'un manipulador asimptomàtic en un brot. Amb aquesta premissa s'ha estudiat també la incidència de les infeccions asimptomàtiques en els manipuladors d'aliments i en treballadors d'institucions sanitàries que havien estat exposats a brots. D'aquests estudis se n'ha fet l'article I i II.

Per altra banda, amb la finalitat de caracteritzar què és el que té lloc a nivell intra-individu amb més profunditat, s'han desenvolupats protocols de seqüenciació massiva per a l'estudi de la diversitat viral, i comparar la diversitat observada entre individus d'un mateix brot. L'anàlisi de les quasiespècies mitjançant les noves tècniques de seqüenciació en aquestes situacions permet conèixer amb gran magnitud i detall què és el que està circulant, així com veure els patrons de transmissió. Permet, en gran mesura, la caracterització de les comunitats virals.

Aquests protocols i la seva anàlisi s'han posat a punt en aquesta tesi tant per HuNoV com per HAV. En el cas dels HuNoV s'ha desenvolupat per la regió P2 de la càpsida, mentre que per l'HAV s'ha generat un protocol per a caracteritzar la regió de la càpsida en la seva totalitat i així, en episodis de brots per HAV, es pot obtenir la màxima informació genòmica en poc temps i estudiar que té lloc a nivell individual i determinar-ne la importància a nivell poblacional.

D'aquests estudis se n'ha generat l'article III i IV.

Estudi de l'epidemiologia clínica i molecular dels brots de HuNoV i de la incidència d'infeccions en els manipuladors d'aliments i/o treballadors d'institucions sanitàries mitjançant la seqüència consens.

El primer article d'aquesta tesi es centra en l'estudi de l'epidemiologia clínica i molecular dels brots que van tenir lloc durant els anys 2010, 2011 i 2012 a

Catalunya. Donada les dificultats que existeixen per a la identificació de tots els casos de GEA d'etiologia vírica, una aproximació acceptada com a mètode apropiat per a la investigació sobre l'epidemiologia d'aquests agents és l'estudi dels brots, entenent com a brot l'existència de dos o més persones que presenten una clínica similar sempre que estiguin relacionades epidemiològicament. L'estudi dels brots permet conèixer més fàcilment el mecanisme de transmissió, cosa que no és possible amb l'estudi de casos esporàdics. Tal com s'ha esmentat anteriorment, estudis sobre el paper dels HuNoV en els brots de GEA no bacterians a Espanya indiquen prevalences creixents entre el 2000 i el 2006 [226], però el diagnòstic d'infeccions no es realitza sistemàticament i la seva importància es creu subestimada.

Amb aquesta premissa, el primer article d'aquesta tesi va ser l'estudi dels brots provocats per HuNoV que tingueren lloc a Catalunya, per determinar-ne la prevalença i analitzar la diversitat de soques que circulen a aquesta regió. Es van notificar un total de 169 brots al llarg dels tres anys de l'estudi, negatius per bacteris, paràsits, rotavirus i adenovirus, que afectaren a 3.239 individus. No obstant, es va detectar HuNoV com a únic agent causal al 76% dels brots i en el 24% restant, on hi havia hagut clínica de GEA, no s'hi va trobar la causa. Aquestes dades són similars a les d'altres articles. A l'estudi fet d'entre el 2009-2010 a EEUU per Hall *et al.* [237], dels 4.376 brots de GEA notificats van trobar l'agent causal del 64%, on els HuNoV foren responsables del 68% com a agent únic, i en el 35% no van trobar-hi la causa (l'1% restat eren brots amb agents múltiples). Els brots que queden sense identificar podrien ser deguts algun cas a falsos negatius o que hagin estat causats per altres virus de GEA, com ara sapovirus o astrovirus, entre d'altres. En l'estudi de vigilància d'ambiental i clínica durant el 2013-2016 realitzat per Kazama *et al.* [238] van detectar, en mostres negatives per HuNoV, que el 25% eren degudes a sapovirus, 15% a astrovirus i un 2% a parechovirus.

Del tots els brots dels quals es va poder obtenir la informació genotípica, es va observar un clar predomini del genogrup II (GII) i amb més diversitat de genotips, detectant-se 12 de diferents versus 3 de GI. Dels 12 genotips de GII, el predominant fou el GII.4, essent l'agent únic causant del 58.2% dels brots. Es van aïllar dos genotips de GI i 9 genotips de GII en brots causats per múltiples soques, on també s'hi va trobar, en aquests brots mixtes, el 54% de GII.4. Aquesta elevada *fitness* de GII.4 que predomina mundialment comparat amb altres soques s'associa, entre altres factors, a una major velocitat d'evolució de la càpsida que es veu reflectit en la capacitat d'evasió del virus a les respostes immunes de l'hoste [37].

El GII.4 aproximadament cada 2-3 anys evoluciona cap a una nova variant que acaba reemplaçant a l'existent provocant pics de brots. Aquestes noves variants creen pandèmies i s'han anat observant al llarg del temps: al 1996-97, 2002, 2004, 2006, 2009 i 2012. Durant l'estudi vam detectar la substitució de la variant predominant GII.4 New Orleans 2009 per la nova variant que s'havia originat a Sydney, anomenada GII.4 Sydney 2012 [239], tal i com s'havia anat informant a arreu. No obstant, encara que la majoria dels informes indicaven que la variant GII.4 2012 predominava des de finals del 2012, al febrer del 2011 vàrem detectar un brot amb una soca amb un fort agrupament amb les soques del 2012. D'acord amb les observacions que indiquen que les soques 2012 presenten una ràpida diversificació antigènica comparades amb les altres variants [240], també vam observar un major número de posicions variables en aquestes. Pensant que podria ser una soca més virulenta i hipotetitzant que un major nivell d'excreció podia afavorir la seva transmissibilitat, vam mirar si hi havia diferències en els nivells d'excreció comparada amb la 2009, però no se'n van trobar.

Normalment els brots per HuNoV poden tenir lloc durant tot l'any, però en el cas de climes temperats són més freqüents als mesos freds. En el cas de Catalunya, només els brots de GII.4 i els brots amb varis genotips es va detectar amb més freqüència als mesos freds i, solament 4 dels 15 genotips observats (GII.1, GII.4, GII.6 i GII.7), es van detectar durant els 3 anys d'estudi.

Hi va haver un pic de casos no-GII.4 tant a l'estiu del 2011 com del 2012 que tingueren lloc a albergs juvenils, campaments d'estiu o escoles.

Si mirem la diversitat de soques en funció de l'edat, els individus menors de 15 anys tenien la diversitat viral més elevada, amb 10 genotips diferents. Curiosament, en aquest grup d'edat, el genotip GII.4 no va ser el més prevalent. S'observà que aquesta diversitat disminuïa a mesura que augmentava l'edat i el GII.4, del 8% del primer grup d'edat, passava a ser el 82% al grup de majors de 65 anys.

Aquesta elevada diversitat entre els individus més joves també s'ha descrit en altres estudis. En l'article publicat al 2016 [241] descriuen fins a 20 genotips diferents en la regió de la càpsida en individus menors de 5 anys a la població d'una part de Sud Àfrica però, malgrat les dates de l'estudi són semblants (2009-2013), els nostres genotips majoritaris (GII.6, GII.12 i GII.13) i els seus no són els mateixos (GII.4 i GII.3). En l'estudi d'Hernandez *et al.* [242] d'un període semblant al nostre (2010-2014) sobre la població d'una regió de Brasil, també descriuen força diversitat de genotips en nens majors de 10 anys i, en aquest cas, els dos més freqüentment detectats són el GII.4 i el GII.6. A Japó també s'ha vist força variabilitat de soques a la població pediàtrica [42] en els mateixos anys d'estudi que el nostre, i durant el 2016/2017 van observar un increment important de la soca GII.2 que s'havia detectat poc en els anys posteriors. En el nostre cas, aquest genotip també es va detectar a nivells baixos i seria interessant veure si també ha augmentat actualment a la població pediàtrica de Catalunya.

En altres estudis s'ha vist que els infants poden reinfectar-se per un genotip diferent en un període curt de 3 setmanes [243][244] i, com que l'excreció pot durar aquest temps o més, la coinfecció per varis genotips pot ser freqüent, promovent la generació de recombinants, generant com a conseqüència, noves variants. A més, aquesta elevada diversitat en infants comparada amb els adults, suggereix que la protecció immunitària adquirida per la infecció d'algun genotip, pot durar suficient per a prevenir la reinfecció en adults.

A nivell del tipus de transmissió, una mica més de la meitat van ser brots alimentaris, seguits pels brots persona a persona i en molts pocs casos hídrics. Aquesta distribució va ser molt semblant a l'observada en l'estudi anterior del 2004-2005 [225] d'aquí Catalunya. No obstant, si ens fixem en altres indrets, Vega *et al.* [245] observaren molta més quantitat de brots de transmissió alimentària que de persona a persona (84% vs 16%). Els brots d'origen hídic però foren els minoritaris amb molt baixa freqüència, semblant als nostres resultats. De tots els brots alimentaris que es coneixia l'aliment implicat, el marisc va ser la causa del 61%. Això concorda amb el que s'ha anat descrivint llarg de diferents estudis, en que molts dels brots de HuNoV transmesos pels aliments estaven relacionats amb el consum de marisc contaminat [89] [246][247][248][249].

En l'anàlisi de si certs genotips s'associaren en major freqüència amb algun dels tres tipus de transmissió, es va observar que els brots causats per múltiples soques foren, significativament, més associats a transmissió alimentària i més presents als mesos freds. Els dos genotips no-GII.4 que es van trobar amb més freqüència al llarg dels tres anys, el GII.1 i el GII.6, malgrat que no es van trobar diferències significatives, estaven més relacionats amb aquest tipus de transmissió. La relació del GII.6 amb transmissió alimentària s'ha descrit prèviament per Vega *et al.* [245]. També descriuen l'associació del GII.12 amb

aquests tipus de transmissió, que en el nostre cas, malgrat el baix número de brots, també coincideix la prevalença d'aquest genotip amb aquesta transmissió. Tot i que s'ha reportat que el GII.4 està més freqüentment associat a persona-persona [67] en el nostre estudi no vam observar aquesta associació, el 50% havia estat de transmissió alimentària i el 50% de transmissió persona a persona i, tot i ser el genotip més trobat, no se'l va detectar mai en brots d'origen hídic.

En el nostre grup s'havia realitzat un estudi durant els anys 2007-2009 on es va analitzar la presència de HuNoV en aigua de riu i aigua residual [231]. Es van comparar els genotips detectats en aquests estudi previ amb els actuals per determinar si el que circulava a la població era semblant, però es van observar forces diferències; dos del tres genotips que s'havien detectat en major freqüència en aigües, pràcticament no es detectaren en els brots estudiats, mentre que 7 genotips que en aigües es detectaren en molt baixes freqüències, en l'actual estudi s'aïllaren en un número significatiu.

Aquestes diferències que vam observar entre els genotips trobats a l'ambient i els genotips trobats a les femtes dels casos clínics, podrien ser degudes a l'emergència de diferents genotips. No obstant, també podrien ser degudes a l'aparició de variabilitat en les regions dianes dels primers utilitzats, que afectarien l'eficiència del diagnòstic. O també, a diferències en els nivells d'excreció o en els nivells de persistència en el medi ambient d'alguns genotips.

En l'estudi publicat aquest 2018 per de Van Beek *et al.* [31] de les soques circulants a Europa en el període 2005-2016, es veu com el GII.4 ha estat sempre responsable del 70% dels brots notificats. Però a partir del 2015 aquest comença a disminuir i apareix la soca GII.P17_GII.17 com a segona més freqüent, augmentant la seva presència encara més al 2016. Aquesta soca va aparèixer per primer cop a l'Àsia al 2014 i fou àmpliament detectada a gran

part dels països Europeus al 2014-2016, tot i que sense reemplaçar la GII.4. A més, durant la temporada 2016-17, a diverses regions d'Àsia i també a alguns països europeus, s'ha reportat l'emergència de soques del genotip GII.P16_GII.2 [250][251][252] [253].

En el nostre estudi no vam detectar en cap brot la soca GII.17, i només vam detectar 1 brot causat per GII.2.

Com s'ha comentat anteriorment, vam observar clarament el reemplaçament de la soca GII.4 2009 per la variant Sydney 2012. Cal destacar que, a data d'escriptura de tesi, la soca Sydney 2012 es continua detectant. A més, en els brots caracteritzats, s'ha confirmat també l'emergència de GII.17 i GII.2 en la nostra regió (dades no mostrades).

Durant els brots estudiats en l'article I, també es van recollir mostres dels manipuladors d'aliments i/o cuidadors que havien estat presents en l'escenari del brot, tant si havien tingut símptomes com si no. Degut a que l'excreció de HuNoV en femta té lloc durant la fase simptomàtica, però també es perllonga més enllà, podent-se detectar en femtes a més de 4 setmanes d'excreció [254][255] i, degut també, a que l'excreció asimptomàtica de HuNoV en individus sans és comú i amb nivells similars al simptomàtics [115][117], en ocasions, els manipuladors d'aliments (*food handlers*, FHs) sobretot, i els treballadors d'institucions sanitàries (*healthcare workers*, HCWs), s'han relacionat com als causants dels brots [119][232][256][257][258][259]. No obstant, tot i que el paper dels FHs i HCWs en la transmissió de HuNoV és un fet documentat, aquest tipus de treballadors també presenten un major risc de contagiar-se quan es produeix un brot de HuNoV en el seu lloc de feina. Mentre que està clar que estar en contacte amb una persona amb GEA és un factor de risc per l'adquisició de diarrea aguda vírica [260][261], no existeixen gaires estudis que hagin analitzat si treballar en el sector alimentari pot suposar un

risc major d'infeccions per HuNoV. D'aquesta manera, en el segon article de la tesi, s'avalua la taxa d'atac d'infeccions per HuNoV entre els FHs i HCWs en els diferents escenaris on es produeixen brots i, de si el fet de treballar en aquests sectors, comporta un risc major de contraure infeccions per aquest virus.

En el nostre estudi vam observar que el percentatge de treballadors infectats era força notable. No obstant, degut a varis factors com ara que totes les mostres van ser recollides un cop el brot va ser declarat, o a que en alguns casos faltaven evidències epidemiològiques, no es va poder assegurar que els treballadors poguessin haver estat la font d'infecció. En altres estudis on s'ha pogut relacionar el manipulador com a partícip de la infecció, les dades epidemiològiques eren més clares [262][119].

Ozawa *et al.* [117] demostraren la prevalença de HuNoV entre els manipuladors d'aliments en diferents establiments de restauració amb el 19%. A més, detectaren amb un 7% manipuladors asimptomàtics positius per HuNoV associats a brots. En el nostre cas, de tots els treballadors que van ser positius per HuNoV, el 71% van declarar no haver tingut símptomes i només el 29% restant van notificar haver tingut símptomes de GEA. Aquest elevat nombre de personal asimptomàtic però positiu, indica que les infeccions asimptomàtiques entre els treballadors en una situació de brot són força comuns. No obstant, cal tenir en compte que potser les respostes a les preguntes dels epidemiòlegs no eren del tot certes, i ho atribuïm a la por de perdre el lloc de treball o de ser acusats d'haver realitzat una mala praxis. Aquets alts percentatges de positivitat entre els treballadors, remarca la importància d'una bona formació en pautes higièniques tant des de la rentada de mans, dels utensilis, com de les superfícies on es manipulen els aliments.

Vam observar que les infeccions asimptomàtiques eren menys freqüents en els HCWs comparades amb els FHs. Un aspecte important que podria estar relacionat amb la incidència de símptomes seria la dosi en el moment d'infecció

i el seu origen. Normalment, els HWCs estan més exposats a dosis més elevades de virus degut a que el seu treball implica el contacte directe amb molts pacients i comparteixen molts més espais, on la dispersió del virus per episodis de vòmits i diarrea és més fàcil. Els vòmits, a diferència de l'excreció de virus en femtes, tenen més probabilitats de produir una contaminació ambiental significativa, afavorint la transmissió a través de fomites i gotetes aerotransportades [263][264]. S'han investigat varis brots on el vòmit ha estat un contribuent significatiu en el risc de transmissió, ja sigui per la contaminació de les superfícies o perquè es generen microgotetes que poden ser inhalades a través de la boca [265][266]. En la investigació d'un gran brot en una escola d'infants entre 4-11 anys, Marks *et al.* [267] van descriure que el risc de patir GEA augmentava amb cada incident de vòmit que es produïa a l'aula.

En canvi, els FHs es poden contaminar per menjar aliments que ja estan contaminats o per compartir el lloc de feina amb algú que estigui infectat. Atenent doncs els nostres resultats, la taxa d'infecció en un escenari de brot és similar entre els dos col·lectius de treballadors però els HCWs tenen més probabilitat de tenir símptomes de GEA.

Per altra banda, es va mirar si es podia confirmar la relació epidemiològica entre els manipuladors i/o cuidadors asimptomàtics amb els pacients mitjançant l'anàlisi de les seqüències. Normalment per al tipatge de mostres es seqüencia la regió C que engloba la unió entre ORF1 i ORF2, que és més conservada i permet distingir els diferents genotips, no obstant, la seqüenciació del domini P2 també s'ha usat amb èxit per a identificar rutes de transmissió i pacients vinculats epidemiològicament, ja que al ser una regió hipervariable, proporciona una resolució suficient per a vincular casos [268]. No obstant, aquests estudis previs també han analitzat la cinètica de variació que es pot observar en aquesta regió al llarg del temps, detectant canvis de seqüència passats només 4 dies des de la infecció i, fins a un 10% de variació en mostres

preses al cap de 3 setmanes [268]. Això indica que cal tenir en compte que hi pot existir aquesta variabilitat a l'utilitzar aquesta regió per a confirmar la relació epidemiològica entre individus. En el nostre cas, degut a que en els treballadors asimptomàtics és totalment impossible conèixer amb exactitud el moment exacte d'infecció, sobre tot si no es tracta de brots d'exposició única, vam utilitzar ambdues regions genòmiques per a fer la interpretació. Així, tenint en compte les seqüències de la regió C, del domini P2, i les dades epidemiològiques, vam poder lligar 7 dels 10 brots analitzats ja que tenien la regió C idèntica i el domini P2 amb 1 o 2 canvis.

En dos dels tres brots restants, ambdós de transmissió persona a persona i que havien tingut lloc a centres socio-sanitaris, es van observar un elevat nombre de substitucions, però degut a la falta d'informació sobre el moment d'infecció d'aquests treballadors asimptomàtics, no es va poder descartar que els canvis fossin deguts a una evolució del virus dins de l'hoste. En aquest cas, l'anàlisi de la regió C altament conservada, va ser de gran utilitat per confirmar que les soques dels individus asimptomàtics no estaven relacionades amb el brot. Aquests resultats ens remarquen que les infeccions dels HCWs per soques nosocomials poden ser recurrents, ja que s'ha descrit que en entorns on els individus són immunocompromesos aquest poden estar crònicament infectats per HuNoV, actuar com a reservori i contribuir a la transmissió nosocomial [269].

En l'anàlisi de la càrrega viral vam observar que la meitat de les mostres seguien sent positives passat 19 dies tant en els individus simptomàtics com en els asimptomàtics, sense diferències entre ells en relació a la duració d'excreció ni en la càrrega viral. Els nostres resultats de durada d'excreció es mouen amb valors similars descrits a la bibliografia [254][270]. En estudis previs s'ha descrit que l'excreció de HuNoV en persones d'edat avançada l'excreció és més

prolongada en el temps [84], però en el nostre cas, no vam trobar diferències degut a que al ser manipuladors i/o cuidadors tots formaven part d'un rang d'edat similar (mitjana de 40 anys) i per tant la durada també ho va ser.

Aquests dos estudis han proporcionat el coneixement de quins són els genotips que circulen a la població de la regió de Catalunya i com evolucionen. S'ha pogut veure que la vigilància dels HuNoV és necessària, tant a nivell de genotip, de tipus de transmissió i d'origen de la contaminació. A més, a molts d'aquests brots s'hi va observar un elevat número de treballadors asimptomàtics, sobretot entre el col·lectiu de FHs que, malgrat no presentar símptomes, presentaven nivells d'excreció tant alts com els dels simptomàtics. Això demostra que cal remarcar la higiene rigorosa i la formació dels operaris per a que siguin conscients de la importància de les seves praxis en qualsevol moment, malgrat l'absència de simptomatologia.

En el cas d'espais de convivència i atenció com residències d'avis, l'elaboració d'un pla de neteja i desinfecció en situacions de brot pot evitar la seva expansió [271]. Els organismes de salut pública de diferents països com Austràlia, Irlanda, el Regne Unit i els EEUU han emès directrius per a la gestió de brots en institucions de salut [272][273][274][275]. En tots ells s'inclouen implementar polítiques sobre higiene de mans, aïllament de pacients, exclusió del personal treballador, restricció de les visites, millora de la neteja i desinfecció [276]. A Catalunya també hi ha un pla de mesures recomanades davant d'un brot epidèmic de GEA en residències d'avis, on s'especifiquen 12 pautes a seguir, semblants a les anteriors. Tot i això, la identificació del brot el més ràpid possible és un aspecte clau per a l'inici de les mesures de control de la infecció.

Estudi de la població viral en brots causats per HuNoV i per HAV mitjançant NGS.

La necessitat de donar respostes ràpides a brots extensos a molts territoris, necessita la implementació de protocols que proporcionin la màxima informació genòmica en el mínim de temps possible. A més, conèixer la població viral mitjançant NGS present a un brot, ofereix informació important tant a nivell intra-individual com a nivell de la població.

L'estudi de la diversitat genètica de la població viral en el seu conjunt és molt més informatiu que no pas centrar-se únicament en les soques virals dominants. L'estudi amb profunditat permet detectar aquelles variants víriques menys abundants que no es podrien detectar amb la seqüenciació convencional de Sanger i que poden tenir un paper molt important si presenten mutacions i s'acaben seleccionant.

La utilització de tècniques de seqüenciació massiva en l'estudi de la diversitat viral en infeccions cròniques i agudes per HuNoV ha permès veure com l'estat de salut del pacient afecta la diversitat vírica [46][213][277], així com també, conèixer d'una forma més precisa la font d'infecció i la direcció de transmissió d'un brot [278].

L'estudi de quasiespècies mitjançant NGS en brots d'HAV, en canvi, no s'ha fet gaire. Fent una recerca bibliogràfica només un article, Wu *et al.* [279] usen NGS per a l'anàlisi de la regió 5' d'un brot d'HAV. Tot i que els brots per HuNoV són molt més freqüents que els d'HAV, actualment s'està veient un augment de casos entre el col·lectiu MSM, on els brots per HAV són més recurrents afectant a un elevat número d'individus. Des del 2016 i vigent encara al 2018, hi ha un brot entre MSM de grans dimensions que s'inicià a Taiwan [280] i que a data d'avui, ja ha afectat a 22 països d'EU/EEA [281] i a Amèrica [282][283].

En el tercer i quart article s'ha desenvolupat un protocol de seqüenciació amb 454/GS-Junior de Roche i amb MiSeq d'Illumina per HuNoV i per HAV, respectivament. S'han analitzat diferents mostres pertanyents a dos brots de HuNoV i al brot MSM 2016-2018 d'HAV per a caracteritzar les quasiespècies circulants.

En el cas de HuNoV, es coneix que els individus crònicament infectats, majoritàriament pacients immunodeprimits, són una font de noves variants degut a l'acumulació de mutacions durant la prolongada replicació viral [47][284][285][286]. Tot i estar documentat, l'evolució viral i la distribució de quasiespècies entre els individus simptomàtics i asimptomàtics no s'ha estudiat amb suficient detall. Amb aquesta premissa i amb l'observació dels resultats de l'article II, en l'article III es va analitzar la diversitat viral en individus simptomàtics i asimptomàtics. La idea de l'estudi era veure si hi havia diferències en el nivell de variabilitat de la població viral intra-hoste amb o sense símptomes.

Si ens fixem tant en el simptomàtics com en els asimptomàtics, vam observar que la comunitat viral de HuNoV en infeccions agudes és força baixa i homogènia en individus immunocompetents, observació que també s'ha descrit en altres articles [46][213][287]. En el cas de Hasing *et al.* [213] no detecten cap SNP mentre que Bull *et al.* [46] detectaren de 5 a 8 SNPs, uns valors similars als nostres.

Vam observar que el patró d'evolució del virus al llarg del temps era força diferent en els dos individus estudiats, tots dos amb símptomes. Mentre que en un individu no es va observar cap canvi passats 8 dies en l'únic l'haplotip que es va detectar, en l'altre individu, en només 5 dies de diferència entre la primera i la segona mostra, vam observar un increment de la diversitat viral amb un augment de 15 haplotips. Malgrat que és una diversitat notable, és menor a la

trobada en individus que estan crònicament infectats per NoV amb un sistema immunitari deficient [46][213][277]. Aquesta diferència de diversitat viral pot ser deguda a factors concrets de l'individu com ara la seva genètica, si ha patit infeccions prèvies per diferents soques, o a la font d'infecció, entre d'altres.

Malgrat no es va observar correlació entre la càrrega i la diversitat viral, l'individu amb la càrrega inicial més alta va ser el que tenia major diversitat al llarg del temps i, per tant, la càrrega viral pot ser un paràmetre important en el patró d'evolució del virus. Els virus de RNA no tenen capacitat correctora i una replicació viral més extensa pot tenir com a conseqüència una taxa de mutació més alta dins de l'hoste. L'efecte que tenen els factors relacionats amb l'hoste respecte la varietat d'haplotips intra-individu es va observar en el brot alimentari, ja que malgrat havia estat causat per una font comú (marisc contaminat), els dos individus del brot presentaven una diversitat viral força diferent. En aquest brot alimentari, el pacient amb GEA només es va observar 1 haplotip mentre que en l'asimptomàtic se'n van observar 6 de diferents. En l'altre brot analitzat, de transmissió interpersonal i que havia tingut lloc en una llar d'avis, també es va observar una major diversitat d'haplotips en els individus asimptomàtics. Aquest fet ens fa pensar que els individus infectats de forma asimptomàtica també poden actuar com a reservori de noves variants. No obstant, caldria estudiar-ho confirmar-ho utilitzant un major número de mostres.

L'anàlisi mitjançant NGS també va permetre confirmar la circulació de més d'una variant en un dels brots estudiats en l'article II. Els haplotips trobats en els simptomàtics i asimptomàtics eren força diferents. Com s'ha comentat anteriorment, la circulació de soques nosocomials és freqüent en institucions amb individus immunodeprimits, com ho poden ser la gent de la tercera edat [288][289][290][291]. No obstant, la transmissió de virus entre els individus

simptomàtics i asimptomàtics tampoc pot ser descartada de forma absoluta. Bull *et al.* [46] van veure que variants amb freqüències de nivells molt baixos, menors de 0.01%, s'havien transmès del donador al receptor mentre que la variant majoritària no s'havia trobat en el receptor. En el nostre cas, les seqüències no trobades amb una abundància mínima del 0.1% van ser descartades i, amb l'observació de Bull *et al.*, es podria especular que disminuint el filtre s'haurien pogut detectar.

Tot i el baix nombre d'individus analitzats, en l'estudi es va observar que els individus amb un major número d'haplotips van ser els treballadors de la residència geriàtrica en comparació als treballadors del brot alimentari. Segurament es deu a que els treballadors i/o cuidadors d'aquests centres, tal com s'ha comentat anteriorment, estan exposats amb més risc a episodis de vòmits i diarrea, on les variants minoritàries es podrien disseminar més fàcilment.

Si ens fixem què té lloc a nivell de nucleòtid i d'aminoàcid, el 6.4% de posicions nucleotídiques van ser variables, amb més canvis no-sinònims que no pas sinònims. Tal i com està descrit, les transicions (96.5%) van detectar-se amb molta més freqüència que les transversions (3.5%), on la gran majoria eren substitucions U-a-C seguides d'A-a-G. Aquestes transicions s'han descrit prèviament [292]. Cuevas *et al.* van observar que una gran fracció de mutacions de HuNoV estava constituïda per substitucions d'U-a-C i d'A-a-G, i van suggerir que podien haver estat causades per l'acció d'algunes proteïnes codificades per l'hoste: les adenosindesaminases específiques de RNA de doble cadena (ADAR). L'edició del genoma RNA per part d'aquests enzims cel·lulars, que sovint se sobre-expressen també com a part de la resposta cel·lular antivírica, sembla ser un procés que progressivament es va descrivint per a més virus RNA de grups diversos [293]. Així doncs, a més de la gran diversitat genètica dels virus de RNA

originada, principalment, per la baixa fidelitat de les seves polimerases durant la replicació, la hipermutació conduïda per l'hoste també és una font de diversitat.

Aquest estudi s'ha fet amb individus infectats pel genotip GII.4. Està ben documentat que aquest genotip és capaç de generar noves variants mitjançant l'acumulació de mutacions, que permet als nous mutants escapar de la resposta immunitària [35][37][72][294]. La deriva antigènica és una força motriu important per a les soques de GII.4. En el nostre cas, s'han detectat varis SNPs en els dos brots estudiats, dels quals 21 han donat lloc a canvis no-sinònims en llocs que s'havien descrit prèviament. Un dels SNP va tenir lloc directament a l'epítot A, a la posició 294 on vam detectar el canvi de serina enlloc de la prolina. Aquesta posició s'ha vist que varia àmpliament [69] i el canvi detectat ja s'havia descrit. Vam observar també un canvi directament a l'epítot D d'una isoleucina enlloc d'una treonina. Aquest epítot compren tres residus variables a les posicions 393, 394 i 395. Nosaltres vam detectar el canvi a la 394 que malgrat estava en molt baixa freqüència, la soca del 2009 no ha variant a aquesta posició des del 2006 [295].

L'altre canvi que vam observar directament a l'epítot va ser en el residu 413 de l'epítot E. Totes les mostres dels individus simptomàtics del brot presentaven una treonina enlloc d'una isoleucina i cap dels asimptomàtics tenia aquesta treonina. La posició 413 a la soca 2009 s'hi ha descrit la isoleucina, però a la soca 2012 la treonina. Aquestes dues mostres, malgrat la data de la mostra és similar a la de les altres, tenien més similitud que la resta amb la variant 2012.

Amb la NGS hem pogut veure que l'alta diversitat en els asimptomàtics pot contribuir a l'expansió d'aquelles variants minoritàries, ja que si presenten avantatges poden acabar sent majoritàries i generar nous brots.

En el cas de l'HAV, l'estudi de les quasiespècies mitjançant seqüenciació massiva és poc freqüent. L'estudi recent d'HAV amb NGS s'ha fet al nostre grup, on Pérez-Rodríguez *et al.* [296] van identificar variants minoritàries amb una *fitness* major suprimides pel conjunt de la quasiespècie. L'anàlisi de les variants que circulen tant en brots com casos esporàdics mitjançant NGS no s'ha fet gaire i, en quasi tots, només s'ha mirat la seqüència consens. Obtenir la màxima informació genòmica en episodis de brots permet veure que és el que està tenint lloc tant a nivell poblacional com individual, podent ser una eina d'importància rellevant.

Els brots d'hepatitis A entre el grup de MSM estan en alça, essent considerats un grup de risc d'infecció [130] [281] [297][298]. A més, degut a l'àmplia xarxa dels MSM, s'ha vist que els brots d'HAV en aquest grup són persistents, ja que el virus es manté en circulació durant llargs períodes de temps.

La principal mesura de prevenció en contextos de brots, com el que circula a Europa des del 2016 (comentat anteriorment a l'apartat 1.2.7.2.), és la vacunació contra l'HAV a tots els MSM i els seus contactes propers per evitar casos secundaris. No obstant, actualment la disponibilitat de la vacuna a l'EU és limitada a alguns països. Això és degut als problemes de producció (és lenta de fabricar) juntament a una demanda major de la vacuna que excedeix a les existències. Per intentar allargar-les el màxim de temps possible, s'ha hagut d'implantar certes pautes de vacunació a varis països i també a Catalunya [299]. S'ha vist però, que amb la presència de pressions immunoselectives, poden aparèixer variants que s'escapin de la vacuna. Aquest fet ja es va observar en l'estudi publicat al 2011 pel nostre grup on Pérez-Sautu *et al.* [203] van descriure l'aïllament de variants antigèniques del lloc immunodominant durant un brot d'hepatitis A a Barcelona al 2008-2009 entre els MSM, en aquest cas per seqüenciació de Sanger. Dels individus estudiats, el 4% havien estat vacunats i el 88% d'ells només havien rebut una sola dosi.

En aquest l'estudi amb NGS, vam observar l'eixam de quasiespècies on algunes variants presentaven canvis localitzats directament o a prop dels llocs antigènics de la càpsida. Degut a la dinàmica de quasiespècie de l'HAV, que apareguin variants al voltant dels epítops és un fet normal i ho hem vist perquè se'n van detectar a tots els individus, tant en els vacunats com en els no-vacunats. Ara bé, només els vacunats tenien unes abundàncies més altes i, juntament amb les mesures comunament usades per a comparar la diversitat de quasiespècies virals i que proporcionen una àmplia informació sobre la complexitat de l'espectre de mutants [300], es va observar selecció positiva de les variants, sobretot en dos dels pacients vacunats.

En general, la vacuna contra l'HAV és altament efectiva. Tot i així, s'han descrit alguns casos on la vacuna no ha funcionat. En alguns, els pacients eren immunocompetents [200][201][202] i tots ells s'havien infectat en viatges a zones endèmiques d'HAV i, malgrat portar dues dosis, van desenvolupar la malaltia. En altres casos, eren individus HIV positius [301][302][303]. També està documentat l'administració de la vacuna com a una bona mesura preventiva post-exposició [304][305], no obstant, s'ha descrit algun cas on no ha funcionat [304].

En persones immunocompetents, la vacuna és altament immunogènica amb taxes de seroconversió del 90-94% després de la primera dosi i del 100% després de la segona en una vacuna monovalent [306]. En canvi, en pacients HIV positius les taxes de seroconversió són menors, i oscil·len entre el 49,6% i el 94% després de la segona dosi de la vacuna monovalent [307]. Per tant, la resposta immunitària a la vacuna contra HAV es redueix en els pacients immunodeprimits.

En quant a les pautes de vacunació en immunocompetents hi ha certa controvèrsia. En l'estudi per Vizzotti *et al.* [308] d'Argentina, suggereixen dosi

única en lactants, i veuen un descens dels casos d'hepatitis A i, per tant, es tractaria d'una pauta és molt més econòmica. A Catalunya, la pauta vacunal del 2016 són dues dosis, una als 15 mesos i una als 6 anys. I, només per als infants susceptibles de patir la malaltia, una tercera al 11-12 anys [309].

Segons el model matemàtic de l'estudi de Clemens *et al.* al 1995 [310], amb dues dosis de vacuna, que induïen títols d'anticòs elevats, s'esperava que protegissin durant uns 20 anys a la població immunocompetent. Dades més recents del 2017 corroboren aquesta afirmació [311]. No obstant, en aquest últim estudi suggereixen un règim complet de 3 dosis de vacuna combinada (HAV+HBV).

En l'estudi de Raczniak *et al.* [312] del 2013, comenten que no troben diferències en vacunar els infants amb dues o tres dosis, ja que troben bona immunogenicitat en ambdós grups, fins al menys 17 anys. Ara bé, passat més temps no es coneix bé i tenint en compte que com més edat de l'individu més severa és la malaltia i, que els MSM són un grup de risc d'infecció, les campanyes de vacunació en aquets col·lectiu són molt importants. Segurament, una dosi de record pot ajudar a augmentar els títols d'anticòs si han passat més de 20 anys.

Donat també que la resposta a la vacuna es redueix en adults, una dosi major o recordatori pot ser beneficiós [313].

S'ha vist que la protecció en el cas de pacients infectats amb HIV és menor, de 6 a 10 anys [314].

En el nostre estudi teníem 4 pacients que havien estat vacunats amb la Twinrix. A dos d'ells se'ls va considerar òptimament vacunats per haver rebut, o dues dosis durant la infantesa o dues dosis dos anys abans de l'inici de la malaltia. Els altres dos se'ls va considerar subòptimament vacunats perquè, o bé havien rebut solament una dosi 15 mesos abans de l'inici de la malaltia, o dues dosis però durant el període de incubació.

El cas del pacient que va rebre la vacuna de nen petit, presentava una diversitat moderada però amb freqüències elevades. En aquest cas, l'individu tenia 34 anys al moment de la infecció i, per tant, feia més de vint anys que havia estat vacunat. Una explicació del perquè va emmalaltir podria ser que, a l'haver passat més de 20 anys, els nivells d'anticossos haguessin disminuït i, a l'haver entrat en contacte amb el virus, els baixos nivells d'anticòs no haurien neutralitzat la infecció. Tanmateix, amb els valors alts d'abundància de les mutacions al costat dels llocs immundominants que vam observar i, fins i tot, amb una mutació directament al lloc immunodominant de VP3 (l'aminoàcid 70), suggeria que els nivells d'anticossos eren baixos per neutralitzar el virus però suficients perquè aquest tingués una pressió i facilitar la selecció de variants d'escapament. En aquest cas, una tercera dosi de record podria haver previngut la infecció.

En canvi, l'altre individu òptimament vacunat, era HIV positiu i la seva diversitat i abundància de mutants s'assemblava més als no-vacunats.

Dels dos pacients considerats subòptimament vacunats, un va rebre solament una dosi i la diversitat que presentà fou moderada. En canvi, l'individu vacunat durant el període d'incubació, presentà una mutació que afectava el lloc immunodominant a elevada proporció. Com l'HAV replica principalment durant el període d'incubació, vam observar que vacunant un cop l'individu està infectat es poden generar mutants d'escapament. La replicació dels virus no neutralitzats en presència de baixes IgG específiques, pot contribuir a seleccionar, entre l'eixam de mutants generats per la dinàmica de replicació de quasiespècie, aquella variant que és resistent als efectes de la vacuna. En altres situacions on el nivell de virus d'entrada és baixa, com en el cas de transmissió per aliments, segurament baixes concentracions de IgG podrien ser efectives per a neutralitzar la infecció. Pel contrari, en el cas dels MSM, on la transmissió és fecal-oral per pràctiques sexuals de risc, els nivells d'exposició als virus són

elevats. S'han descrit valors alts com 10^{11} partícules víriques per gram de femta en individus HIV positius a les dues setmanes d'inici de símptomes [194].

En l'estudi de Link-Gelles *et al.* [313] publicat al 2018 fan una revisió sobre l'ús de la vacuna com a profilaxis post-exposició en adults majors de 40 anys, malgrat que descriuen la falta de dades en aquest sentit. En general assenyalen que la resposta a la vacuna en adults majors de 40 anys durant les dues setmanes post-exposició es desconeix, però que segurament és més del 70% en individus d'entre 40-49 anys. Suggereixen que la vacuna usada com a profilaxi post-exposició ha de ser subministrada tant aviat com sigui possible dins d'uns 14 dies. No obstant, en aquests estudis no es mira com pot afectar a nivell de la quasiespècie viral.

En estudis previs on es parla de que la vacuna ha fallat s'assumeix que es per falta de seroconversió. Creiem però, que cal estudiar-ho detalladament. Gràcies a les tècniques de seqüenciació massiva hem pogut detectar en dos pacients que, amb l'elevada abundància observada d'alguna mutació, directament o a prop dels llocs immunodominats, suggeria que hi havia presència d'IgG però a baixes concentracions i, per tant, pressionant per a que es generin variants d'escapament. En canvi, dos dels vacunats sí que presentaven uns valors d'abundància a prop dels llocs immunodominants similars als no-vacunats, indicant que potser realment no havien generat cap resposta. Tanmateix, aquets dos individus eren HIV-positius (un d'ells amb una sola dosi de vacuna) i reforça l'observació de Launay *et al.* [315] en que, subministrant 3 dosis de 1440 U els individus tenien un títol d'anticossos més elevat, amb una resposta més ràpida i duradora en pacients amb cèl·lules T CD4+ entre 200 i 350 per mil·límetre cúbic. El nostre cas en canvi, hi havia un individu amb 1440 U i un amb 720 U i, per tant, una dosi més hagués ajudat a augmentar el títol d'anticòs. No obstant, recentment s'ha descrit el cas d'un MSM HIV positiu que,

tot i tenir nivells de CD4 al moment de la vacunació majors de 550/ μ l, i estar vacunat amb tres dosis, (dos dosis al 2014 i la tercera al 2017), va desenvolupar la malaltia [302]. Hagués estat molt interessant en aquest últim estudi, la visió de les quasiespècies per NGS per veure la diversitat de la població vírica.

Curiosament i per sorpresa nostre, vam observar que els HIV positius tenien una càrrega d'HAV, en general, més baixa; fet contrari al que s'ha descrit [316]. Potser, al ser tractats contra l'HIV amb fàrmacs més nous, aquests afectessin d'alguna manera la replicació de l'HAV. Però això no s'ha estudiat i cal avaluar-ho i analitzar-ho detalladament, i amb un número major de mostres.

Com s'ha comentat anteriorment, en l'estudi previ del nostre grup per Pérez-Sautu *et al.* [203], també es van aïllar mutants d'escapament a la vacuna en el brot MSM del 2008-2009 amb mutació al lloc immunodominant de VP1. Donat que els aïllats d'HAV de mostres no es poden cultivar *in vitro*, es van fer servir uns mutants resistents a anticossos monoclonals contra el lloc immunodominant per imitar el comportament de les variants aïllades del brot. Aquests mutants s'havien descrit en un estudi previ, també al nostre grup, per Aragonès *et al.* [167]. Van observar que quan replicaven en presència de l'anticòs, eren capaços de superar el virus salvatge però després d'un procés lent. En canvi, en absència d'anticòs era el salvatge el que superava completament als mutants, indicant un baix *fitness*. De fet, les variants d'escapament trobades al brot MSM 2008-2009 no van circular gaire temps [180]. Ara bé, van veure que mutants amb canvis a la regió del lloc d'unió a la glicoforina A tenien una *fitness in vitro* semblant a la soca salvatge i, en l'estudi actual, s'ha observat que les mutacions a aquesta regió augmentaven amb el pas del temps i, per tant, podrien arribar a ser un problema.

Els mutants d'escapament permeten la supervivència i replicació dels virus davant la resposta immunitària de l'hoste contra la vacunació prèvia. Com hem vist en aquest estudi i en anteriors, la vacunació pot ser una força evolutiva important per l'HAV, fet rellevant ja que només s'ha descrit un serotip per a aquest virus. L'HAV usa codons rars a la regió que codifica per a la càpsida per a aconseguir un plegament adequat d'aquestes proteïnes fent que sigui altament estable [167]. Aquest requisit podria evitar la generació de variants suficientment distants com per a classificar-les com un nou serotip. Però, malgrat aquestes restriccions, hem observat variants antigèniques en individus prèviament vacunats. Per tant, la immunització parcial per la capacitat limitada de generar una bona resposta immune, pot permetre la replicació viral amb càrregues víriques suficients per a estendre's.

Veient que en els últims anys els casos d'hepatitis A entre el grup MSM estan en alça, una bona pauta de vacunació és necessària, pensada tant a nivell dels individus com a nivell de la població viral. Si alguna variant d'escapament a la vacuna dels pacients vacunats hagués passat a un individu vacunat, segurament, la vacunació en el segon no li hagués fet efecte. Per tant, aquestes variants d'escapament poden arribar a ser un problema de salut pública.

Amb les nostres observacions, es pot suggerir un monitoratge del títol d'anticossos anti-HAV en el grup MSM al cap d'un temps d'haver estat vacunat, per oferir una dosi potenciadora en aquells que no s'hagin protegit del tot, per evitar la generació de variants d'escapament.

En aquets dos estudis, l'ús de la NGS ens ha permès obtenir gran quantitat d'informació de la població viral intra-hoste i ens ha proporcionat la visió de lupa de les quasiespècies circulants, on hem pogut veure com n'és d'específica l'evolució del virus en cada individu.

A més, en l'estudi d'HAV, el desenvolupament d'un protocol per l'anàlisi de la totalitat de la càpsida mitjançant NGS s'ha vist que pot ser una eina útil de cara el futur, tant en episodis de brot com en casos esporàdics, ja que s'obté molta informació del que circula a la població amb un temps relativament curt.

Mentre que per seqüenciació de Sanger les potencials variants d'escapament no les haguéssim vist, amb la NGS hem pogut veure el potencial genètic d'algunes d'elles i identificar aquelles variants que malgrat ser minoritàries poden tenir un paper en l'emergència de nous serotips.

Així doncs, si el que es vol és descriure què circula majoritàriament a la població per una vigilància epidemiològica, la seqüència consens ja és suficient. Ara bé, si es vol fer un pas més enllà i veure el conjunt de la població viral, la NGS permet veure la seva complexitat.

CONCLUSIONS

- De tots els brots de possible etiologia vírica durant 2010-2012, el 76% van ser deguts a HuNoV. El 54.6% dels brots van ser alimentaris, el 44.3% de transmissió persona a persona i, en molts pocs casos d'origen hídric, amb el 4.1%.
- Es van detectar 15 genotips diferents (GI.3, GI.4, GI.7, GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, i GII.21). El genotip GII.4 va ser el més prevalent i es va detectar en un 64% dels brots.
- Es va observar l'emergència de la nova soca GII.4 Sydney 2012, que malgrat els seus nivells d'excreció eren semblants a la soca anterior GII.4 2009, va acabar reemplaçant-la. Les característiques clíniques dels brots GII.4 2009 i GII.4 2012 van ser semblants.
- Les taxes d'atac de HuNoV entre els manipuladors d'aliments i els treballadors sanitaris en escenaris de brots van ser similars (46.4% vs 60.4%), però el percentatge d'infeccions asimptomàtiques fou significativament més alt entre els manipuladors d'aliments (77.9% vs 28.1%).
- L'elevat número de manipuladors i cuidadors asimptomàtics positius per HuNoV detectats, amb cinètiques i nivells d'excreció similars als simptomàtics durant més de 19 dies, demostra que cal remarcar la importància d'una bona higiene a tots els nivells.
- S'han desenvolupat uns protocols eficients i sensibles de NGS per a l'estudi de les quasiespècies circulants, un per HuNoV i un per l'HAV, que poden ser eines útils i importants per a la salut pública.

- La diversitat viral intra-hoste en les infeccions agudes per HuNoV és força específica d'individu, detectant-se un nivell de variabilitat genètica lleugerament major entre els individus amb infeccions asimptomàtiques, suggerint que poden ser una font de generació de noves variants i contribuir a la seva expansió.
- En el brot d'hepatitis A, els individus vacunats van presentar una diversitat nucleotídica més elevada i amb més proporció directament o a prop dels llocs immunodominants que els no vacunats, indicant selecció positiva de variants antigèniques.
- Es va observar una distribució de mutacions diferents al llarg del temps, essent al final més freqüents al lloc d'unió a la glicoforina A.
- Unes bones pautes de vacunació són importants per evitar al màxim l'aparició de variants d'escapament a la vacuna, sobretot en el grup de risc MSM, ja que poden arribar a ser un problema greu per tota la població.

BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Bosch A, Pintó RM, Guix S. *Foodborne viruses*. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:110–9.
- [2] Dolin R, Blacklow N, DuPont H, Formal S, Buscho R, Kasel J, et al. *Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates*. *J Infect Dis*. 1971;123(3):307–12.
- [3] Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD, Parashar UD. *The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control*. *PLoS One*. 2016;13(4):e1001999.
- [4] Yen C, Tate JE, Hyde TB, Cortese MM, Lopman BA, Jiang B, et al. *Rotavirus vaccines: current status and future considerations*. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(6):1436–48.
- [5] *WHO position paper on hepatitis A vaccines – June 2012*. *Wkly Epidemiol Rec / Heal Sect Secr Leag Nations*. 2012;87(28/29):261–76.
- [6] Pintó RM, Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, Bosch A. *Hepatitis a virus: State of the art*. *Food Environ Virol*. 2010;2(3):127–35.
- [7] Vasickova P, Dvorska L, Lorencova A, Pavlik I. *Viruses as a cause of foodborne diseases: A review of the literature*. *Vet Med – Czech*. 2005;50(3):89–104.
- [8] Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. *World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010*. *PLoS Med*. 2015;12(12):e1001923.
- [9] King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International*

- Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press; 2012.
- [10] Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J, Saif LJ. *Characterization of an Enteropathogenic Bovine Calicivirus Representing a Potentially New Calicivirus Genus*. J Virol. 2002;76(20):10089–98.
- [11] Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. *Taxonomy of the Caliciviruses*. J Infect Dis. 2000;181(Supp. 2):S322-30.
- [12] Zahorsky J. *Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease*. Arch Pediatr Adolesc Med. 1929;46:391–95.
- [13] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. *Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis*. J Virol. 1972;10(5):1075–81.
- [14] Adler J, Zickl R. *Winter vomiting disease*. 1969;119(6):668–73.
- [15] Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T FS. *An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home*. J Med Virol. 1979;4(4):249–54.
- [16] Nakata S, Kogawa K, Numata K, Ukae S, Adachi N, Matson D. O., Estes M. K. CS. *The epidemiology of human calicivirus/Sapporo/82/Japan*. Arch Virol. 1996;12:263–70.
- [17] Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. *Sapporo Virus: History and Recent Findings*. J Infect Dis. 2000;181(Suppl2):S303–S308.
- [18] Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. *Norwalk virus genome cloning and characterization*. Science. 1990;250(4987):1580–3.

-
- [19] Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. *Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein*. J Virol. 1992;66(11):6527–32.
- [20] Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes L, Grau KR, et al. *Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells*. Science. 2014;346(6210):755–9.
- [21] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. *Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids*. Science. 2016;353(6306):1387–93.
- [22] Bartnicki E, Cunha JB, Kolawole AO, Wobus CE. *Recent advances in understanding noroviruses [version 1; referees: 2 approved]*. F1000Research. 2017;6(F1000 Faculty Rev):79.
- [23] Green KY. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 949–79.
- [24] Thorne LG, Goodfellow IG. *Norovirus gene expression and replication*. J Gen Virol. 2014;95(Pt_2):278–91.
- [25] Hardy ME. *Norovirus protein structure and function*. FEMS Microbiol Lett. 2005;253(1):1–8.
- [26] Donaldson EF, Lindesmith LC, LoBue AD, Baric RS. *Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system*. Nat Rev Microbiol. 2010;8(3):231–41.
- [27] Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. *Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors*. Trends Microbiol. 2004;12(6):279–87.

- [28] Vinjé J. *Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus*. J Clin Microbiol. 2015;53(2):373–81.
- [29] Bull RA, Tanaka MM, White PA. *Norovirus recombination*. J Gen Virol. 2007;88(12):3347–59.
- [30] Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, et al. *Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping*. Arch Virol. 2013;158(10):2059–68.
- [31] van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. *Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: An epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network*. Lancet Infect Dis. 2018;18(5):545–53.
- [32] Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswo ME, Castro CJ, Magaña LC, et al. *Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 ecombinant viruses*. J Clin Microbiol. 2017;55(7):2208–21.
- [33] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. *An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses*. J Clin Virol. 2011;51(2):121–5.
- [34] Lauring AS, Frydman J, Andino R. *The role of mutational robustness in RNA virus evolution*. Vol. 11, Nature Reviews Microbiology. 2013. p. 327–36.
- [35] Bull RA, Eden J-S, Rawlinson WD, White PA. *Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage*. PLoS Pathog. 2010;6(3):e1000831.
- [36] Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, et al. *Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations*.

- PLoS Med. 2008;5(2):e31.
- [37] Bull RA, White PA. *Mechanisms of GII.4 norovirus evolution*. Trends Microbiol. 2011;19(5):233–40.
- [38] Eden J-S, Hewitt J, Lim KL, Boni MF, Merif J, Greening G, et al. *The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012*. Virology. 2014;450–451:106–13.
- [39] Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, Lao J, et al. *Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015*. Emerg Infect Dis. 2015;21(7):1240–2.
- [40] De Graaf M, Van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. *Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era?* Euro Surveill. 2015;20(26):pii=21178.
- [41] Pan L, Xue C, Fu H, Liu D, Zhu L, Cui C, et al. *The novel norovirus genotype GII.17 is the predominant strain in diarrheal patients in Shanghai, China*. Gut Pathog. 2016;8(1):1–3.
- [42] Thongprachum A, Okitsu S, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. *Emergence of norovirus GII.2 and its novel recombination during the gastroenteritis outbreak in Japanese children in mid-2016*. Infect Genet Evol. 2017;51:86–8.
- [43] Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X, et al. *Norovirus GII.P16/GII.2-associated gastroenteritis, China, 2016*. Emerg Infect Dis. 2017;23(7):1172–5.
- [44] Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hübinger AM, Hofmann J, Zimmermann O, et al. *Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016*. Euro

- Surveill. 2017;22(4):pii= 30447.
- [45] Bidalot M, Théry L, Kaplon J, De Rougemont A, Ambert-Balay K. *Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017*. Euro Surveill. 2017;22(15):pii= 30508.
- [46] Bull RA, Eden J-S, Luciani F, Mcelroy K, Rawlinson WD, White PA. *Contribution of Intra- and Interhost Dynamics to Norovirus Evolution*. J Virol. 2012;86(6):3219–29.
- [47] Debbink K, Lindesmith LC, Ferris MT, Swanstrom J, Beltramello M, Corti D, et al. *Within-host evolution results in antigenically distinct GII.4 noroviruses*. J Virol. 2014;88(13):7244–55.
- [48] Vashist S, Bailey D, Putics A, Goodfellow I. *Model systems for the study of human norovirus biology*. Future Virol. 2009;4(4):353–67.
- [49] Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev S V, Belliot G, et al. *Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages*. PLoS Biol. 2004;2(12):e432.
- [50] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK. *Laboratory efforts to cultivate noroviruses*. J Gen Virol. 2004;85(1):79–87.
- [51] Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, et al. *Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans*. Virology. 2010;406(1):1–11.
- [52] Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinjé J. *Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models*. PLoS One. 2013;8(6):e63485.

-
- [53] Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, et al. *Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures*. Arch Virol. 2014;159(2):257–66.
- [54] Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ. *Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro*. PLoS One. 2018;13(2):e0178157.
- [55] Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, De Graaf M, Freiden P, et al. *Human norovirus culture in B cells*. Nat Protoc. 2015;10(12):1939–47.
- [56] Brown JR, Gilmour K, Breuer J. *Norovirus Infections Occur in B-Cell-Deficient Patients*. Clin Infect Dis. 2016;62(9):1136–8.
- [57] Sato T, Stange DE, Ferrante M, J Vries RG, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. *Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett’s Epithelium*. YGAST. 2011;141(5):1762–72.
- [58] Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, et al. *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells*. Nat Med. 2011;17(10):1225–7.
- [59] Saxena K, Blutt SE, Ettayebi K, Zeng X-L, Broughman JR, Crawford SE, et al. *Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology*. J Virol. 2015;90(1):43–56.
- [60] Wobus CE. *The dual tropism of noroviruses*. J Virol. 2018;JVI.01010-17.
- [61] Lee S, Wilen CB, Orvedahl A, McCune BT, Kim KW, Orchard RC, et al. *Norovirus Cell Tropism Is Determined by Combinatorial Action of a Viral*

- Non-structural Protein and Host Cytokine*. Cell Host Microbe. 2017;22(4):449–59.
- [62] Wilen CB, Lee S, Hsieh LL, Orchard RC, Desai C, Hykes BL, et al. *Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis*. Science. 2018;360(6385):201–8.
- [63] Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, et al. *Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells*. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(41):E6248–55.
- [64] Orchard RC, Wilen CB, Doench JG, Baldrige MT, McCune BT, Lee YCJ, et al. *Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus*. Science. 2016;353(6302):933–6.
- [65] Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO. *Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin-and cholesterol-dependent pathway*. J Gen Virol. 2010;91(Pt 6):1428–38.
- [66] Perry JW, Wobus CE. *Endocytosis of Murine Norovirus 1 into Murine Macrophages Is Dependent on Dynamin II and Cholesterol*. J Virol. 2010;84(12):6163–76.
- [67] De Graaf M, van Beek J, Koopmans MPGG. *Human norovirus transmission and evolution in a changing world*. Nat Rev Microbiol. 2016;14(7):421–33.
- [68] Tan M, Hegde RS, Jiang X. *The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors*. J Virol. 2004;78(12):6233–42.

- [69] Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, et al. *Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation*. PLoS Pathog. 2012;8(5):e1002705.
- [70] Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, Vinjé J, et al. *Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes*. J Virol. 2013;87(5):2803–13.
- [71] Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, Baric RS. *Genetic Mapping of a Highly Variable Norovirus GII.4 Blockade Epitope: Potential Role in Escape from Human Herd Immunity*. J Virol. 2012;86(2):1214–26.
- [72] Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Costantini V, Beltramello M, Corti D, et al. *Emergence of new pandemic gII.4 sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity*. J Infect Dis. 2013;208(11):1877–87.
- [73] Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. *Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent*. N Engl J Med. 1977;297(2):86–9.
- [74] Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. *Multiple-challenge study of host susceptibility to norwalk gastroenteritis in US adults*. J Infect Dis. 1990 Jan;161(1):18–21.
- [75] Lindesmith LIS a L, Oe CHM, Arionneau SEM, Uvoen NAR, Iang XIJ, Indblad LAL, et al. *Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection*. Nat Med. 2003;9(5):548–53.
- [76] Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. *Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo – Blood Group Type*. J Infect Dis. 2002;185:1335–7.

- [77] Le Pendu J. *Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases*. *Adv Exp Med Biol*. 2004;554:135–143.
- [78] Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, et al. *Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding*. *J Virol*. 2008;82(21):10756–67.
- [79] Glass RI, Parashar UD, Estes MK. *Norovirus gastroenteritis*. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1776–85.
- [80] Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, Ahmed SM, Lake R, Hall AJ, et al. *Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):592–9.
- [81] Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO, Deakin D, et al. *Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant*. *Epidemiol Infect*. 2000;124(3):481–7.
- [82] Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. *Norwalk virus: How infectious is it?* *J Med Virol*. 2008;80(8):1468–76.
- [83] Okhuysen P, Jiang X, Ye L, Johnson P, Estes M. *Viral Shedding And Fecal Iga Response After Norwalk Virus Infection*. *J Infect Dis*. 1995;171(3):566–9.
- [84] Tu ET-V, Bull RA, Kim MJ, McIver CJ, Heron L, Rawlinson WD, et al. *Norovirus excretion in an aged-care setting*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):2119–21.
- [85] Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y. *Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients*. *J Hosp Infect*. 2010;75(1):42–6.

- [86] Raphael Dolin, Neil R. Blacklow, Herbert DuPont, Robert F. Buscho, Richard G. Wyatt, Julius A. Kasel, Richard Hornick RMC. *Biological Properties of Norwalk Agent of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1972;140(2):578–83.
- [87] Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, et al. *Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine*. Appl Environ Microbiol. 1985;50(2):261–4.
- [88] Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. *Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces*. J Hosp Infect. 2004;58(1):42–9.
- [89] Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, Harris J, Hjertqvist M, Jourdan-da Silva N, Koller A, Lenglet A, Lisby M VL. *Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010*. Euro Surveill. 2010;15(12):pii= 19524.
- [90] La MRSA, Carde Osa N, Arias C, Llovet T, Recasens A, Do A, et al. *An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus*. Epidemiol Infect. 2005;133(1):187–91.
- [91] Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, Niskanen T, Korhonen T, Lappalainen M, et al. *Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries*. Epidemiol Infect. 2012;140(2):260–7.
- [92] Bernard H, Faber M, Wilking H, Haller S, Höhle M, Schielke A, et al. *Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012*. Euro Surveill. 2014;19(8):pii= 20719.
- [93] Iturriza-Gómara M, Lopman B. *Norovirus in healthcare settings*. Curr Opin Infect Dis. 2014;27(5):437–43.

- [94] J.P. Harris, B.A. Lopman, S.J. O'Brien. *Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings*. J Hosp Infect. 2010;74(1):1–9.
- [95] Carling PC, Bruno-Murtha LA, Griffiths JK. *Cruise Ship Environmental Hygiene and the Risk of Norovirus Infection Outbreaks: An Objective Assessment of 56 Vessels over 3 Years*. Clin Infect Dis. 2009;49(9):1312–7.
- [96] Koopmans M, Harris J, Verhoef L, Depoortere E, Takkinen J, Coulombier D, et al. *European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update*. Eurosurveillance. 2006;11(27):E060706.
- [97] Bonifait L, Charlebois R, Vimont A, Turgeon N, Veillette M, Longtin Y, et al. *Detection and Quantification of Airborne Norovirus during Outbreaks in Healthcare Facilities*. Clin Infect Dis. 2015;61(3):299–304.
- [98] Lopman B, Gastanaduy P, Woo Park G, J Hall A, D Parashar U, Vinjé J, et al. *Environmental transmission of norovirus gastroenteritis*. Curr Opin Virol. 2011;2(1):96–102.
- [99] Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, Von Bonsdorff C-H. *Outbreak of Viral Gastroenteritis Due to Drinking Water Contaminated by Norwalk-like Viruses*. J Infect Dis. 1999;180:1771–6.
- [100] Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, Cornejo T, et al. *Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016*. Emerg Infect Dis. 2017;23(9):1531–4.
- [101] *Norovirus outbreaks from drinking water*. Emerg Infect Dis. 2005;11(11):1716–21.
- [102] Bosch A. *Human enteric viruses in the water environment: a minireview*.

- Int Microbiol. 1998;1(3):191–6.
- [103] Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. *Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis*. PLoS One. 2016;11(4):e0151219.
- [104] Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. *Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses*. J Infect Dis. 2000;181(s2):S284–7.
- [105] World Health Organization. *Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases*. Geneva; 2015.
- [106] Generalitat de Catalunya. Agència de Salut Pública de Catalunya. *Vigilància ASPCAT* [Internet]. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/ca/actualitat/llista_butlletins/salut_publica/butlleti_vigilancia_en_salut_publica/
- [107] Götz H, Ekdahl K, Lindbäck J, De Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. *Clinical Spectrum and Transmission Characteristics of Infection with Norwalk-Like Virus: Findings from a Large Community Outbreak in Sweden*. Clin Infect Dis. 2001;33(5):622–8.
- [108] Arias C, Sala MR, Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, et al. *Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: a population-based study*. Clin Microbiol Infect. 2010;16(1):39–44.
- [109] Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. *The Frequency of a Norwalk-Like Pattern Of Illness in Outbreaks of Acute Gastroenteritis*. Am J Public Heal. 1982;72(12):1329–32.
- [110] Manish M. Patel, Marc-Alain Widdowson, Roger I. Glass, Kenichiro Akazawa, Jan Vinjé UDP. *Systematic Literature Review of Role of*

- Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis.* Emerg Infect Dis. 2008;14(8):1224–31.
- [111] John P. Harris, W. John Edmunds, Richard Pebody, David W. Brown and BAL. *Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales.* Emerg Infect Dis. 2008;14(10):1546–52.
- [112] Trivedi TK, DeSalvo T, Lee L, Palumbo A, Moll M, Curns A, et al. *Hospitalizations and Mortality Associated With Norovirus Outbreaks in Nursing Homes, 2009-2010.* Jama. 2012;308(16):1668–75.
- [113] Bok K, Green KY. *Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients.* N Engl J Med. 2012;367(22):2126–32.
- [114] Siebenga JJ, Beersma MFC, Vennema H, Van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. *High Prevalence of Prolonged Norovirus Shedding and Illness among Hospitalized Patients: A Model for In Vivo Molecular Evolution.* J Infect Dis. 2008;198(7):994–1001.
- [115] Teunis PFM, Sukhrie FHA, Vennema H, Bogerman J, Beersma MFC, Koopmans MPG. *Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections.* Epidemiol Infect. 2015;143(8):1710–7.
- [116] Gallimore CI, Cubitt D, Du Plessis N, Gray JJ. *Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a Hospital Outbreak of Gastroenteritis.* J Clin Microbiol. 2004;42(5):2271–4.
- [117] Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. *Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan.* J Clin Microbiol. 2007;45(12):3996–4005.
- [118] Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL, Humphrey CD, Miller J, Ando T, et al. *An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of*

- sandwiches: Implications for the control of transmission by food handlers.* Epidemiol Infect. 1998;121(3):615–21.
- [119] Barrabeig I, Rovira A, Buesa J, Bartolomé R, Pintó R, Pallezo H, et al. *Foodborne norovirus outbreak: The role of an asymptomatic food handler.* BMC Infect Dis. 2010;10:269.
- [120] Chen MY, Chen WC, Chen PC, Hsu SW, Lo YC. *An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with asymptomatic food handlers in Kinmen, Taiwan.* BMC Public Health. 2016;16(1):1–6.
- [121] Hall AJ, Wikswo ME, Pringle K, Gould LH, Parashar UD; Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases C, Gould LH PUHAWMPK. *Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012.* MMWR. 2014;63(22):491–5.
- [122] Cuthbert JA. *Hepatitis A: Old and new.* Clin Microbiol Rev. 2001;14(1):38–58.
- [123] Hilleman MR. *Hepatitis and hepatitis A vaccine: a glimpse of history.* J Hepatol. 1993;18(SUPPL. 2):S5-10.
- [124] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. *Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Viruslike Antigen Associated with Acute Illness.* Science. 1973;182(4116):1026–8.
- [125] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016).* Arch Virol. 2016;161(10):2921–49.
- [126] Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, van den Brand JMA, Gmyl AP, Brünink S, et al. *Evolutionary origins of hepatitis A virus in small*

- mammals*. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(49):15190–5.
- [127] Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. *A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes*. Nature. 2013;496(7445):367–71.
- [128] Abad XF, Pinto RM, Bosch A. *Survival of Enteric Viruses on Environmental Fomites*. Appl Environ Microbiol. 1994;60(10):3704–10.
- [129] Walker CM, Feng Z, Lemon SM. *Reassessing immune control of hepatitis A virus*. Curr Opin Virol. 2015;11:7–13.
- [130] Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, Bremer V, Bruisten S, Ngui S, et al. *Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe*. J Med Virol. 2007;79(4):356–65.
- [131] Tortajada C, de Olalla PG, Diez E, Pinto RM, Bosch A, Perez U, et al. *Hepatitis a among men who have sex with men in Barcelona, 1989-2010: Insufficient control and need for new approaches*. BMC Infect Dis. 2012;12:11.
- [132] Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. *In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus*. J Virol. 1994;68(2):1066–74.
- [133] Whetter LE, Day SP, Elroy-Stein O, Brown EA, Lemon SM. *Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells*. J Virol. 1994;68(8):5253–63.
- [134] Tesar M, Harmon SA, Summers DF, Ehrenfeld E. *Hepatitis A virus*

- polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons.* Virology. 1992;186(2):609–18.
- [135] Pintó RM, D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Ribes E, Guix S, et al. *Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines.* Future Microbiol. 2012;7(3):331–46.
- [136] Martin A, Bénichou D, Chao SF, Cohen LM, Lemon SM. *Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase.* J Virol. 1999;73(8):6220–7.
- [137] Martin A, Lemon SM. *Hepatitis A virus: From discovery to vaccines.* Hepatology. 2006;43(2 SUPPL. 1):S164-72.
- [138] Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, et al. *Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses.* Nature. 2015;517(7532):85–8.
- [139] Probst C, Jecht M, Gauss-mu V. *Intrinsic Signals for the Assembly of Hepatitis A Virus Particles: role of structural proteins VP4 and 2A.* Biochemistry. 1999;274(8):4527–31.
- [140] Emerson SU, Huang YK, McRill C, Lewis M, Purcell RH. *Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture.* J Virol. 1992;66(2):650–4.
- [141] Roque-Afonso, Anne Marie Desbois D, Dussaix E. *Hepatitis A virus: serology and molecular diagnostics.* Future Virol. 2010;5(2):233–42.
- [142] Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, et al. *Molecular Evolution of Hepatitis A Virus: a New Classification Based on the Complete VP1 Protein.* J Virol. 2002;76(18):9516–25.

- [143] Cristina J, Costa-Mattioli M. *Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus*. *Virus Res*. 2007;127(2):151–7.
- [144] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A, et al. *Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: Circulation of newly emerging strains*. *J Clin Virol*. 2011;52(2):98–102.
- [145] Andino R, Domingo E. *Viral quasispecies*. *Virology*. 2015;479–480:46–51.
- [146] Sánchez G, Bosch A, Gómez-Mariano G, Domingo E, Pintó RM. *Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome*. *Virology*. 2003;315(1):34–42.
- [147] Domingo E, Baranowski E, Nunez JI, Sierra S, Molina N, Sobrino F. *Cuasiespecies y evolución molecular de virus cuasiespecies e impacto de esta estructura poblacional de los virus RNA*. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2000;19(1):55–63.
- [148] Asher L, Binn L, Mensing T, Marchwicki R, Vassell R, Young G. *Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (Aotus trivirgatus)*. *J Med Virol*. 1995;47(3):260–8.
- [149] Blank CA, Anderson DA, Beard M, Lemon SM. *Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes*. *J Virol*. 2000;74(14):6476–84.
- [150] Ouzilou L, Caliot E, Pelletier I, Prévost MC, Pringault E, Colbère-Garapin F. *Poliovirus transcytosis through M-like cells*. *J Gen Virol*. 2002;83(9):2177–82.
- [151] Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A. *IgA-coated particles*

- of Hepatitis A virus are translocalized antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor.* J Gen Virol. 2005;86(10):2747–51.
- [152] Hirai-Yuki A, Hensley L, Whitmire JK, Lemon SM. *Biliary secretion of quasi-enveloped human hepatitis a virus.* MBio. 2016;7(6):e01998-16.
- [153] Shibayama T, Kojima H, Ashida M, Hirose S, Sato A, Kamimura T, et al. *Localization of hepatitis A virus in marmoset liver tissue during the acute phase of experimental infection.* Gastroenterol Jpn. 1985;20(6):564–72.
- [154] Costafreda MI, Ribes E, Franch A, Bosch A, Pinto RM. *A Single Mutation in the Glycophorin A Binding Site of Hepatitis A Virus Enhances Virus Clearance from the Blood and Results in a Lower Fitness Variant.* J Virol. 2012;86(15):7887–95.
- [155] Feng Z, Lemon SM. *Peek-a-boo: Membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis.* Trends Microbiol. 2014;22(2):59–64.
- [156] Gosert R, Egger D, Bienz K. *A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis a virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements.* Virology. 2000;266(1):157–69.
- [157] Yang Y, Liang Y, Qu L, Chen Z, Yi M, Li K, et al. *Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor.* Proc Natl Acad Sci. 2007;104(17):7253–8.
- [158] Zhang B, Morace G, Gauss-Müller V, Kusov Y. *Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation.* Nucleic Acids Res. 2007;35(17):5975–84.
- [159] Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. *Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis a virus.* J Virol. 2003;77(1):452–9.

- [160] Pintó RM, Pérez-Rodríguez F-J, D'Andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. *Hepatitis A Virus Codon Usage : Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;a031781.
- [161] Bishop NE, Anderson DA. *RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus*. Virology. 1993;197(2):616–23.
- [162] Racaniello V. *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 796–838.
- [163] Nainan O V., Brinton MA, Margolis HS. *Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis a virus*. Virology. 1992;191(2):984–7.
- [164] Ping L-H, Lemon SM, Hill C, Carolina N. *Antigenic structure of human hepatitis A virus against murine monoclonal antibodies*. J Virol. 1992;66(4):2208–16.
- [165] Ping LH, Jansen RW, Stapleton JT, Cohen JI, Lemon SM. *Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(21):8281–5.
- [166] Sánchez G, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. *Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane*. J Virol. 2004;78(18):9807–13.
- [167] Aragonés L, Bosch A, Pinto RM. *Hepatitis A Virus Mutant Spectra under the Selective Pressure of Monoclonal Antibodies: Codon Usage Constraints Limit Capsid Variability*. J Virol. 2008;82(4):1688–700.
- [168] Nainan O V, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. *Diagnosis of Hepatitis A*

- Virus Infection : a Molecular Approach*. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):63–79.
- [169] Abad FX, Pinto RM, Diez JM, Bosch A. *Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine*. Appl Environ Microbiol. 1994;60(7):2377–83.
- [170] Sattar S a, Jason T, Bidawid S, Farber J. *Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation*. Can J Infect Dis. 2000;11(3):159–63.
- [171] Manso CF, Romalde JL. *Detection and Characterization of Hepatitis A Virus and Norovirus in Mussels from Galicia (NW Spain)*. Food Environ Virol. 2013;5(2):110–8.
- [172] Boxman ILA. *Human enteric viruses occurrence in shellfish from european markets*. Food Environ Virol. 2010;2(3):156–66.
- [173] Sánchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. *Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolates from a Transcontinental Shellfish-Borne Outbreak*. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4148–55.
- [174] Roos B. *Hepatitis epidemic transmitted by oysters*. Sven Läkartidningen. 1956;53(16):989–1003.
- [175] Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A. *Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A*. Appl Environ Microbiol. 2009;75(23):7350–5.
- [176] Halliday M, Kang L, Zhou T, Hu M, Pan Q, Fu T, et al. *An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China*. J Infect Dis. 1991;164(5):852–9.
- [177] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *2016 - Multistate*

- outbreak of hepatitis A linked to frozen strawberries (Final Update)* [Internet]. 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2016/hav-strawberries.htm>
- [178] Severi E, Verhoef L, Thornton L, Guzman-Herrador BR, Faber M, Sundqvist L, et al. *Large and prolonged food-borne multistate hepatitis a outbreak in europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014*. Euro Surveill. 2015;20(29):pii=21192.
- [179] Sheretz RJ, Russell BA, Reunman PD. *Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products*. Arch Intern Med. 2005;144:1579–1580.
- [180] D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. *Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents*. Int J Mol Sci. 2015;16(4):6842–54.
- [181] Franco E, Meleleo C, Serino L, Sorbara D, Zaratti L. *Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries*. World J Hepatol. 2012;4(3):68–73.
- [182] Jacobsen KH, Koopman JS. *Declining hepatitis A seroprevalence: A global review and analysis*. Vol. 132, Epidemiology and Infection. 2004. p. 1005–22.
- [183] Jacobsen KH, Wiersma ST. *Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005*. Vaccine. 2010;28(41):6653–7.
- [184] Nothdurft H. *Hepatitis A vaccines*. Expert Rev Vaccines. 2008;7(5):535–45.
- [185] Mazick A, Howitz M, Rex S, Jensen IP, Weis N, Katzenstein TL, et al. *Hepatitis A outbreak among MSM linked to casual sex and gay saunas in*

- Copenhagen, Denmark*. Euro Surveill. 2005;10(5):111–4.
- [186] Tortajada C, de Olalla PG, Pinto RM, Bosch A, Caylà J. *Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008-March 2009*. Euro Surveill. 2009;14(15):pii=19175.
- [187] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Epidemiological update: hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men* [Internet]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-1>
- [188] Lorenzo Ortega R, O'Donnell Cortés B, Ortiz González Serna R, Gallardo García V, López Hernández B. *Changes in Hepatitis A epidemiological pattern in Andalucía: 2007-2017*. Rev Esp Salud Pública. 2018;92:pii:e201805016.
- [189] Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, Lens S, Mariño Z, Costa J, et al. *Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective*. Liver Int. 2017;00:1–6.
- [190] Division of Viral Hepatitis. *Viral Hepatitis - Hepatitis A Information* [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm>
- [191] Previsani N, Lavanchy D, Siegl G. *Hepatitis A*. In: Mushahwar IK, editor. *Viral Hepatitis Molecular Biology Diagnosis and Control*. California: Elsevier; 2004. p. 1–30.
- [192] Koff RS. *Hepatitis A*. Lancet. 1998;351:1643–9.
- [193] Salet de Paula V. *Laboratory diagnosis of hepatitis A*. Future Virol.

- 2012;7(5):461–72.
- [194] Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. *Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples.* Appl Environ Microbiol. 2006;72(6):3846–55.
- [195] Fiore AE, Wasley A, Bell BP. *Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).* MMWR Recomm Rep. 2006;55(RR-7):1–23.
- [196] Stoffel M, Lievens M, Dieussaert I, Martin I, André F. *Immunogenicity of Twinrix™ in older adults: A critical analysis.* Expert Rev Vaccines. 2003;2(1):9–14.
- [197] Beran J, Chlibek R, Weber F. *A combined dual-chamber typhoid/hepatitis A vaccine as a booster dose in hepatitis A primed adults.* Vaccine. 2003;21(32):4650–4.
- [198] Wang XY, Xu ZY, Ma JC, von Seidlein L, Zhang Y, Hao ZY, et al. *Long-term immunogenicity after single and booster dose of a live attenuated hepatitis A vaccine: Results from 8-year follow-up.* Vaccine. 2007;25(3):446–9.
- [199] Xu ZY, Wang XY. *Live attenuated hepatitis A vaccines developed in China.* Hum Vaccines Immunother. 2014;10(3):659–66.
- [200] Elliott JH, Kunze M, Torresi J. *Hepatitis A vaccine failure.* Lancet. 2002;359(9321):1948–9.
- [201] Taliani G, Sbaragli S, Bartoloni A, Tozzi A, Paradisi F, Santini MG. *Hepatitis A vaccine failure: How to treat the threat.* Vaccine.

- 2003;21(31):4505–6.
- [202] Ficko C, Conan PL, Bigaillon C, Duron S, Rapp C. *Santé des voyageurs Hépatite A au retour de Centrafrique chez un militaire français : les échecs vaccinaux sont possibles !* Med Sante Trop. 2015;25:363–4.
- [203] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. *Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence.* Emerg Infect Dis. 2011;17(4):734–7.
- [204] Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ, Moyer LA, Judson FN, Mottram K, et al. *The Diverse Patterns of Hepatitis A Epidemiology in the United States—Implications for Vaccination Strategies.* J Infect Dis. 1998;178(6):1579–84.
- [205] Domínguez Á, Salleras L, Carmona G, Batalla J. *Effectiveness of a mass hepatitis A vaccination program in preadolescents.* Vaccine. 2003;21(7–8):698–701.
- [206] World Health Organization. *WHO | Hepatitis A* [Internet]. 2017. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>
- [207] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463–7.
- [208] Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner A, Fahlander K, et al. *Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing.* PLoS One. 2012;7(2):e30875.
- [209] Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. *Next-generation sequencing technology in clinical virology.* Clin Microbiol Infect. 2013;19(1):15–22.

- [210] Cotten M, Petrova V, Phan MVT, Rabaa MA, Watson SJ, Ong SH, et al. *Deep Sequencing of Norovirus Genomes Defines Evolutionary Patterns in an Urban Tropical Setting*. J Virol. 2014;88(19):11056–69.
- [211] Kundu S, Lockwood J, Depledge DP, Chaudhry Y, Aston A, Rao K, et al. *Next-Generation Whole Genome Sequencing Identifies the Direction of Norovirus Transmission in Linked Patients*. Clin Infect Dis. 2013;57(3):407–14.
- [212] Beerenwinkel N, Zagordi O. *Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations*. Curr Opin Virol. 2011;1(5):413–8.
- [213] Hasing ME, Hazes B, Lee BE, Preiksaitis JK, Pang XL. *A next generation sequencing-based method to study the intra-host genetic diversity of norovirus in patients with acute and chronic infection*. BMC Genomics. 2016;17(1):480.
- [214] Gregori J, Esteban JI, Cubero M, Garcia-Cehic D, Perales C, Casillas R, et al. *Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants*. PLoS One. 2013;8(12):e83361.
- [215] Quer J, Rodríguez-Frias F, Gregori J, Tabernero D, Soria ME, García-Cehic D, et al. *Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections*. Virus Res. 2016;239:115–25.
- [216] Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. *High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods*. J Clin Microbiol. 2015;53(1):219–26.
- [217] Heather JM, Chain B. *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. Genomics. 2016;107(1):1–8.

- [218] Mardis ER. *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. Trends Genet. 2008;24(3):133–41.
- [219] Bleidorn C. *Third generation sequencing: Technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research*. Syst Biodivers. 2016;14(1):1–8.
- [220] Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules*. Science. 2009 Jan 2;323(5910):133–8.
- [221] Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. *Norovirus*. Clin Microbiol Rev. 2015;28(1):134–64.
- [222] Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, Pothier P. *The burden of norovirus gastroenteritis: An important foodborne and healthcare-related infection*. Clin Microbiol Infect. 2014;20(8):724–30.
- [223] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Hepatitis A virus in the EU/EEA, 1975–2014*. Stockholm: ECDC. Stockholm; 2016.
- [224] Buesa J, Collado B, López-Andújar P, Abu-Mallouh R, Rodríguez Díaz J, García Díaz A, et al. *Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain*. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2854–9.
- [225] Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, Barrabeig I, Camps N, et al. *Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005*. J Clin Virol. 2008;43(1):126–31.
- [226] Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes J, M.Bartolomé R, et al. *Sequential Evolution of Genotype GII.4 Norovirus Variants Causing Gastroenteritis Outbreaks From 2001 to 2006 in Eastern Spain*. J Med

- Viol. 2008;80(7):1096–9071.
- [227] Junquera CG, De Baranda CS, Mialdea OG, Serrano EB, Sánchez-Fauquier A. *Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain*. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):604–7.
- [228] Manso CF, Torres E, Bou G, Romalde JL. *Role of norovirus in acute gastroenteritis in the Northwest of Spain during 2010–2011*. *J Med Virol*. 2013;85(11):2009–15.
- [229] Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E. *Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012*. *PLoS One*. 2014;9(6):e98875.
- [230] Manso CF, Romalde JL. *Molecular epidemiology of norovirus from patients with acute gastroenteritis in northwestern Spain*. *Epidemiol Infect*. 2015;143(2):316–24.
- [231] Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. *Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain*. *Environ Microbiol*. 2012;14(2):494–502.
- [232] Godoy P, Alsedà M, Bartolomé R, Clavería D, Módol I, Bach P, et al. *Norovirus gastroenteritis outbreak transmitted by food and vomit in a high school*. *Epidemiol Infect*. 2016;144(9):1951–58.
- [233] Thornley CN, Hewitt J, Perumal L, Van Gessel SM, Wong J, David SA, et al. *Multiple outbreaks of a novel norovirus GII.4 linked to an infected post-symptomatic food handler*. *Epidemiol Infect*. 2013;141(8):1585–97.
- [234] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. *Norwalk virus infection of volunteers: New insights based on improved*

- assays*. J Infect Dis. 1994;170(1):34–43.
- [235] Gray JJ, Cunliffe C, Ball J, Graham DY, Desselberger U, Estes MK. *Detection of immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus*. J Clin Microbiol. 1994;32(12):3059–63.
- [236] Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, et al. *A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses: First Molecular Traceback to Deli Sandwiches Contaminated during Preparation*. J Infect Dis. 2000;181(4):1467–70.
- [237] Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH. *Acute Gastroenteritis Surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States*. Emerg Infect Dis. 2013;19:1305-09.
- [238] Kazama S, Miura T, Masago Y, Konta Y, Tohma K, Manaka T, et al. *Environmental surveillance of norovirus genogroups I and II for sensitive detection of epidemic variants*. Appl Environ Microbiol. 2017;83(9):e03406-16.
- [239] van Beek Jankovanbeek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. *Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012*. Euro Surveill. 2013;18(1):pii= 20345.
- [240] Fonager J, Hindbaek LS, Fischer TK. *Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012*. Euro Surveill. 2013;18(9):pii= 20413.
- [241] Mans J, Murray T, Nadan S, Netshikweta R, Page N, Taylor M. *Norovirus*

- diversity in children with gastroenteritis in South Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate.* Epidemiol Infect. 2016;144(5):906–16.
- [242] Hernandez JM, Silva LD, Junior ECS, Bandeira RS, Rodrigues EAM, Lucena MSS, et al. *Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil.* BMC Infect Dis. 2018;18:147.
- [243] Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, Velasquez D, Cabrera L, Loli S, et al. *Multiple norovirus infections in a birth cohort in a peruvian periurban community.* Clin Infect Dis. 2014;58(4):483–91.
- [244] Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, et al. *Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: A 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis.* J Infect Dis. 2015;211(6):879–88.
- [245] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. *Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states, 2009 to 2013.* J Clin Microbiol. 2014;52(1):147–55.
- [246] Cheng PKC, Wong DKK, Chung TWH, Lim WWL. *Norovirus contamination found in oysters worldwide.* J Med Virol. 2005;76(4):593–7.
- [247] Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, et al. *Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption.* J Clin Microbiol. 2006;44(11):3878–82.
- [248] Hansman G, Oka T, Li T, Nishio O, Noda M, Takeda N. *Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams.* J Food Prot. 2008;71(8):1689–

95.

- [249] Baker K, Morris J, McCarthy N, Saldana L, Lowther J, Collinson A, et al. *An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010*. J Public Heal. 2011;33(2):205–11.
- [250] Thanusuwannasak T, Puenpa J, Chuchaona W. *Emergence of multiple norovirus strains in Thailand, 2015 – 2017*. Infect Genet Evol. 2018;61:108–12.
- [251] Hata M, Nakamura N, Kobayashi S, Onouchi A, Saito T, Hirose E, et al. *Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 in Aichi, Japan, during the 2016/17 season*. Jpn J Infect Dis. 2018;[Epub ahead of print].
- [252] Ao Y, Cong X, Jin M, Sun X, Wei X, Wang J, et al. *Genetic Analysis of Re-Emerging GII.P16–GII.2 Noroviruses in 2016–2017 in China*. J Infect Dis. 2018;218(1):133–43.
- [253] Medici MC, Tummolo F, Martella V, De Conto F, Arcangeletti MC, Pinaridi F, 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. 2018;41(1):1–72.
- [254] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. *Norwalk virus shedding after experimental human infection*. Emerg Infect Dis. 2008;14(10):1553–7.
- [255] Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, Lee LE, Bierhoff M, Biggs C, et al. *Epidemiologic, Virologic, and Host Genetic Factors of Norovirus Outbreaks in Long-term Care Facilities*. Clin Infect Dis. 2016;62(1):1–10.
- [256] Nicolay N, McDermott R, Kelly M, Gorby M, Prendergast T, Tuite G, et al.

- Potential role of asymptomatic kitchen food handlers during a food-borne outbreak of norovirus infection, Dublin, Ireland, March 2009.* Euro Surveill. 2011;16(30):pii= 19931.
- [257] Smith KC, Inns T, Decraene V, Fox A, Allen DJ, Shah A. *An outbreak of norovirus GI-6 infection following a wedding in North West England.* Epidemiol Infect. 2017;145(6):1239–45.
- [258] Franck KT, Lisby M, Fonager J, Schultz AC, Böttiger B, Villif A, et al. *Sources of calicivirus contamination in foodborne outbreaks in denmark, 2005-2011-the role of the asymptomatic food handler.* J Infect Dis. 2015;211(4):563–70.
- [259] Huttunen R, Syrjänen J. *Healthcare workers as vectors of infectious diseases.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(9):1477–88.
- [260] Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. *Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community.* Epidemiol Infect. 2011;139(11):1676–86.
- [261] Arena C, Amoros JP, Vaillant V, Ambert-Balay K, Chikhi-Brachet R, Silva NJ Da, et al. *Acute diarrhea in adults consulting a general practitioner in France during winter: Incidence, clinical characteristics, management and risk factors.* BMC Infect Dis. 2014;14:574.
- [262] Friedman DS, Heisey-Grove D, Argyros F, Berl E, Nsubuga J, Stiles T, et al. *An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with wedding cakes.* Epidemiol Infect. 2005;133(6):1057–63.
- [263] Kirby AE, Streby A, Moe CL. *Vomiting as a Symptom and Transmission Risk in Norovirus Illness: Evidence from Human Challenge Studies.* PLoS One. 2016;11:e0143759.

- [264] de Graaf M, Villabruna N, Koopmans MP. *Capturing norovirus transmission*. *Curr Opin Virol*. 2017;22:64–70.
- [265] Evans MR, Meldrum R, Lane W, Gardner D, Ribeiro CD, Gallimore CI, et al. *An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall*. *Epidemiol Infect*. 2002;129(2):355–60.
- [266] Petrigiani M, van Beek J, Borsboom G, Richardus JH, Koopmans M. *Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: A systematic review and meta-analysis of observational studies*. *J Hosp Infect*. 2015;89(3):163–78.
- [267] Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. *A school outbreak of Norwalk-like virus: Evidence for airborne transmission*. *Epidemiol Infect*. 2003;131(1):727–36.
- [268] Sukhrie FHA, Teunis P, Vennema H, Bogerman J, van Marm S, Beersma MFCT, et al. *P2 domain profiles and shedding dynamics in prospectively monitored norovirus outbreaks*. *J Clin Virol*. 2013;56(4):286–92.
- [269] Sukhrie FHA, Siebenga JJ, Beersma MFC, Koopmans M. *Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4303–5.
- [270] Lai CC, Wang YH, Wu CY, Hung CH, Jiang DDS, Wu FT. *A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age*. *J Clin Virol*. 2013;56(2):96–101.
- [271] Park GW, Williamson KJ, Debess E, Cieslak PR, Gregoricus N, De Nardo E, et al. *High Hand Contamination Rates during Norovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(2):219–21.

- [272] Communicable Disease Network Australia. *Guidelines for the public health management of gastroenteritis outbreaks due to norovirus or suspected viral agents in Australia*. 2010.
- [273] National Disease Surveillance Centre Ireland. *National guidelines on the management of outbreaks of norovirus infection in healthcare settings*. 2003.
- [274] Health Protection Agency, British Infection Association, Healthcare Infection Society, Infection Prevention Society, National Concern for Healthcare Infections NHSC. *Guidelines for the management of norovirus outbreaks in acute and community health and social care settings*. 2012.
- [275] MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, Lee I, Kuntz G, Stevenson KB. *Guideline for the Prevention and Control of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in Healthcare Settings*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(10):939–69.
- [276] Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J, et al. *Infection control for norovirus*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(8):731–40.
- [277] Van Beek J, De Graaf M, Smits S, Schapendonk CME, Verjans GMGM, Vennema H, et al. *Whole-Genome Next-Generation Sequencing to Study Within-Host Evolution of Norovirus (NoV) among Immunocompromised Patients with Chronic NoV Infection*. *J Infect Dis*. 2017;216(12):1513–24.
- [278] Nasheri N, Petronella N, Ronholm J, Bidawid S, Corneau N. *Characterization of the genomic diversity of norovirus in linked patients using a metagenomic deep sequencing approach*. *Front Microbiol*. 2017;8:1–14.
- [279] Wu S, Nakamoto S, Kanda T, Jiang X, Nakamura M, Miyamura T, et al.

- Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source.* Int J Med Sci. 2013;11(1):60–4.
- [280] ProMED-mail. Hepatitis A - Taiwan: Increased MSM incidence. *Archive* [Internet]. 2016. p. 4230111. Available from: <http://www.promedmail.org/post/20160518.4230111>
- [281] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men - third update, 28 June 2017.* Stockholm: ECDC. 2017;
- [282] Latash J, Dorsinville M, Del Rosso P, Antwi M, Reddy V, Waechter H, et al. *Notes from the Field: Increase in Reported Hepatitis A Infections Among Men Who Have Sex with Men — New York City, January–August 2017.* MMWR. 2017;66(37):999–1000.
- [283] Rivas V, Barrera A, Pino K, Núñez R, Caceres CJ, Lopez-Lastra M, et al. *Hepatitis a outbreak since november 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017.* Euro Surveill. 2018;23(9):pii= 18-00060.
- [284] Vega E, Donaldson E, Huynh J, Barclay L, Lopman B, Baric R, et al. *RNA Populations in Immunocompromised Patients as Reservoirs for Novel Norovirus Variants.* J Virol. 2014;88(24):14184–96.
- [285] Hoffmann D, Hutzenthaler M, Seebach J, Panning M, Umgelster A, Menzel H, et al. *Norovirus GII.4 and GII.7 capsid sequences undergo positive selection in chronically infected patients.* Infect Genet Evol. 2012;12(2):461–6.

- [286] Steyer A, Konte T, Sagadin M, Kolenc M, Škoberne A, Germ J, et al. *Intrahost norovirus evolution in chronic infection over 5 years of shedding in a kidney transplant recipient*. Front Microbiol. 2018;9:371.
- [287] Karst SM, Baric RS. *What Is the Reservoir of Emergent Human Norovirus Strains?* J Virol. 2015;89(11):5756–9.
- [288] Godoy P, Ferrus G, Torner N, Camps N, Sala MR, Guix S, et al. *High incidence of norovirus GII.4 outbreaks in hospitals and nursing homes in Catalonia (Spain), 2010-2011*. Epidemiol Infect. 2015;143(4):725–33.
- [289] Sideroglou T, Kontopidou F, Mellou K, Maragos A, Potamiti-Komi M, Gerakis T, et al. *Management and investigation of viral gastroenteritis nosocomial outbreaks: Lessons learned from a recent outbreak, Greece, 2012*. Hippokratia. 2014;18(3):204–8.
- [290] Valentini D, Ianiro G, Di Bartolo I, Di Camillo C, Boccuzzi E, Vittucci AC, et al. *Hospital-acquired rotavirus and norovirus acute gastroenteritis in a pediatric unit, in 2014-2015*. J Med Virol. 2017;89(10):1768–74.
- [291] Sukhrie FHA, Beersma MFC, Wong A, Van Der Veer B, Vennema H, Bogerman J, et al. *Using molecular epidemiology to trace transmission of nosocomial norovirus infection*. J Clin Microbiol. 2011;49(2):602–6.
- [292] Cuevas JM, Combe M, Torres-Puente M, Garijo R, Guix S, Buesa J, et al. *Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing*. Infect Genet Evol. 2016;41:233–9.
- [293] Tomaselli S, Galeano F, Locatelli F, Gallo A. *Adars and the balance game between virus infection and innate immune cell response*. Curr Issues Mol Biol. 2015;17:37–52.
- [294] Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, Debbink K, Swann EW,

- Vinjé J, 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. 2018;217(7):1145–1152.
- [295] Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. *Norovirus Immunity and the Great Escape*. PLoS Pathog. 2012;8(10):1–5.
- [296] Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, De Castellarnau M, Costafreda MI, Guix S, Ribes E, et al. *Improving virus production through quasispecies genomic selection and molecular breeding*. Sci Rep. 2016;6:35962.
- [297] Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. *Risk groups for hepatitis A virus infection*. Vaccine. 2003;21(19–20):2224–33.
- [298] Urbanus A, van Houdt R, van de Laar T, Coutinho R. *Viral hepatitis among men who have sex with men, epidemiology and public health consequences*. Euro Surveill. 2009;14(47):pii= 19421.
- [299] Generalitat de Catalunya. *Nota informativa sobre la normalització de l’ús de la vacuna contra l’hepatitis A en adults (HA)* [Internet]. 2017. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut_responsiu/salutAZ/V/vacunacions/documents/hepatitis_ha.pdf
- [300] Gregori J, Perales C, Rodriguez-Frias F, Esteban JI, Quer J, Domingo E. *Viral quasispecies complexity measures*. Virology. 2016;493:227–37.
- [301] Mor Z, Lurie Y, Katchman E. *A case of hepatitis A vaccination failure in an HIV-positive man who had sex with men in Israel*. Int J STD AIDS. 2012;23(7):529–30.
- [302] Fritzsche C, Loebermann M, Reisinger EC. *A case of acute hepatitis A infection in an HIV-positive patient despite complete hepatitis A*

- vaccination*. Infection. 2018;[Epub ahead of print].
- [303] Lee MJ, Douthwaite S, Kulasegaram R. *Acute hepatitis A infection after hepatitis A immunity in a HIV-positive individual*. Sex Transm Infect. 2018;94:30–1.
- [304] Whelan J, Sonder GJ, Bovée L, Speksnijder A, van den Hoek A. *Evaluation of Hepatitis A Vaccine in Post-Exposure Prophylaxis, The Netherlands, 2004-2012*. PLoS One. 2013;8(10):e78914.
- [305] Parrón I, Planas C, Godoy P, Manzanares-Laya S, Martínez A, Sala MR, et al. *Effectiveness of hepatitis A vaccination as post-exposure prophylaxis*. Hum Vaccines Immunother. 2017;13(2):423–7.
- [306] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Prevention of hepatitis A through active or passive immunization*. MMWR. 2006;55:1–23.
- [307] Mena G, García-Basteiro A, Bayas J. *Hepatitis B and A vaccination in HIV-infected adults: A review*. Hum Vaccin Immunother. 2015;11(11):2582–98.
- [308] Vizzotti C, González J, Gentile A, Rearte A, Ramonet M. *Impact of the Single-dose Immunization Strategy Against*. Pediatr Infect Dis J. 2014;33(1):84–8.
- [309] Generalitat de Catalunya. Agència de Salut Pública de Catalunya. *Calendari de vacunacions vigent a Catalunya. Seguretat dels Pacients* [Internet]. Available from: <http://seguretatdelspacients.gencat.cat/ca/detalls/noticia/Actualitat-00351>
- [310] Clemens R, Safary A, Hepburn A, Roche C, Stanbury WJ, André FE.

- Clinical experience with an inactivated hepatitis A vaccine.* J Infect Dis. 1995;171:1–2.
- [311] Van Damme P, Leroux-Roels G, Suryakiran P, Folschweiller N, Van Der Meeren O. *Persistence of antibodies 20 y after vaccination with a combined hepatitis A and B vaccine.* Hum Vaccines Immunother. 2017;13(5):972–80.
- [312] Racznik GA, Thomas TK, Bulkow LR, Negus SE, Zanis CL, Bruce MG, et al. *Duration of protection against hepatitis A for the current two-dose vaccine compared to a three-dose vaccine schedule in children.* Vaccine. 2013;31(17):2152–5.
- [313] Link-Gelles R, Hofmeister MG, Nelson NP. *Use of hepatitis A vaccine for post-exposure prophylaxis in individuals over 40 years of age: A systematic review of published studies and recommendations for vaccine use.* Vaccine. 2018;36:2745–2750.
- [314] Crum-Cianflone NF, Wilkins K, Lee AW, Grosso A, Landrum ML, Weintrob A, et al. *Long-term durability of immune responses after hepatitis A vaccination among HIV-infected adults.* J Infect Dis. 2011;203(12):1815–23.
- [315] Launay O, Grabar S, Gordien E, Desaint C, Jegou D, Abad S, et al. *Immunological efficacy of a three-dose schedule of hepatitis A vaccine in HIV-infected adults: HEPAVAC study.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2008;49(3):272–5.
- [316] Ida S, Tachikawa N, Nakajima A, Daikoku M, Yano M, Kikuchi Y, et al. *Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on acute hepatitis A virus infection.* Clin Infect Dis. 2002;34:379–85.

