



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Impacte i control dels brots de gastroenteritis per norovirus a Catalunya (2017-2019) i estudi de la presència del virus a la saliva

Eduard Anfruns Estrada

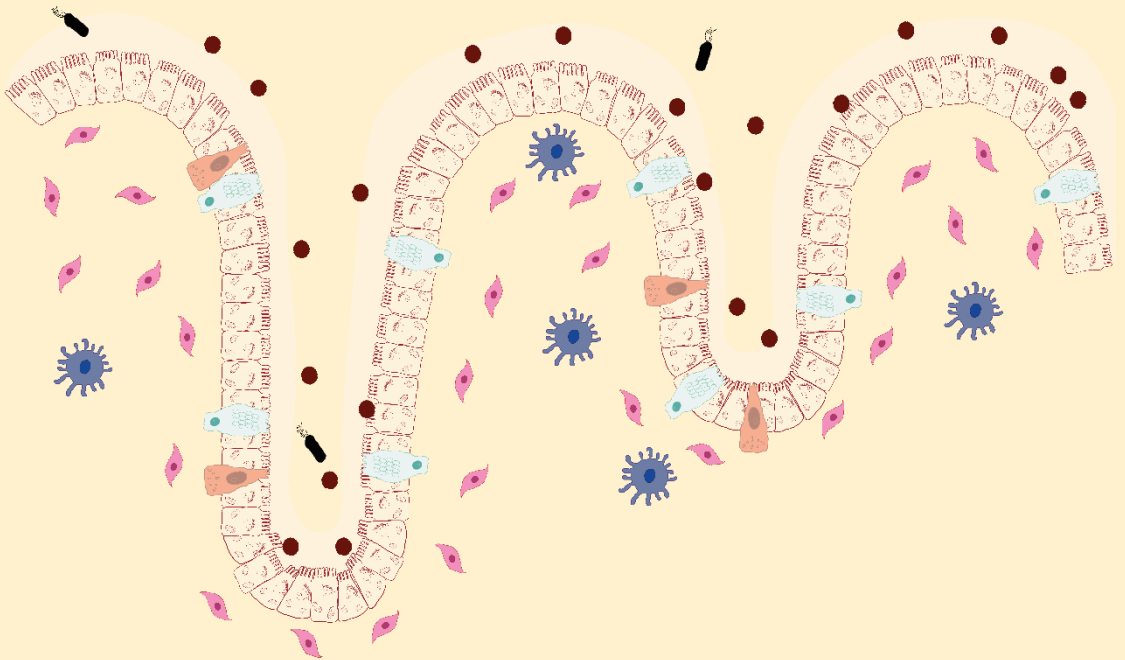
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada 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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

# Impacte i control dels brots de gastroenteritis per norovirus a Catalunya (2017-2019), i estudi de la presència del virus a la saliva

Tesi doctoral



Eduard Anfruns Estrada





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorat de Biotecnologia

Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística  
Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

## Impacte i control dels brots de gastroenteritis per norovirus a Catalunya (2017-2019), i estudi de la presència del virus a la saliva

Memòria presentada per Eduard Anfruns Estrada per optar al grau  
de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Directora i tutora

**Dra. Susana Guix Arnau**

Director

**Dr. Albert Bosch Navarro**

Doctorand

**Eduard Anfruns Estrada**

Barcelona, 2022



Als meus pares,

Per la seva realització d'aquesta tesi doctoral es va rebre finançament de l'Institut de Salut Carlos III a través del projecte PI16/02005, l'Agència Catalana per la Gestió de Beques per la Universitat (número de subvenció AGAUR 2017/SGR 1342) i del programa Horizon 2020 European Union a través del projecte número 727580.

La il·lustració de la portada és obra d'Albert Carcereny basada en una imatge publicada a *Nature Communications* (2020).

## AGRAÏMENTS

Vull començar les primeres paraules d'agraïment d'aquesta tesi cap a la **Dra. Susana Guix**, qui n'ha estat la tutora i directora, i m'ha acompanyat durant aquests quatre anys, fent possible un pas important en la meua carrera acadèmica i personal. Conjuntament amb el **Dr. Albert Bosch**, director d'aquesta tesi, m'han donat l'oportunitat de poder aprofundir, estudiar i gaudir de la recerca en el camp de la virologia. Faig també una menció especial a la **Dra. Rosa Maria Pintó** com a co-directora del Grup de Virus Entèrics, agraint l'oportunitat i la confiança per poder-ne formar part.

Continuo cap a les persones que m'han seguit més directament en el transcurs d'aquest temps, a tots els amics i companys del laboratori **Albert B., Nerea, Carce, Gemma, Montse, Cristina, David i Aurora**. Pel vostre suport, generositat i per tots els bons moments que hem passat cada dia. Faig també extensives aquestes paraules a la resta d'amics de la secció de microbiologia que no podria deixar de mencionar en aquest apartat **Aiora, Genoveva, Robert, Manuel, Sílvia, Raquel, Xavi, Eva, Ayalke, Marta I., Maria, Pol, Sandra, Cristina, Míriam, Alejandro, Marta R, Laura, Quim** i a tots els membres de la secretaria.

A qui també estaré sempre agraït és a la sort de formar part d'un grup d'amics i amigues únic, al de la colla del *Temple*, **Herena, Marc, Guillem, Cristina B., Judit, Josep, Cristina C, Alba, Jordi E., Clara, Eva, Irene, Ferran, Anna, Aida O., Gerard, Natàlia, Roser, Marina, Aida S., Jordi S., Pau i Jordi V**. Gràcies per la gran quantitat d'experiències viscudes i per fer-me arribar fins aquí! Sou irremplaçables! I per aquest mateix motiu, tampoc em deixo al **Carles, Maria, Joana, Carla i Laura**.



Després de dotze anys a Barcelona i d'un Grau en Ciències Biomèdiques i posterior Màster en Microbiologia, agraeixo el gran repte i experiència personal que han suposat. I per l'altra, d'haver-ho fet acompanyat de les Feres, persones a qui admiro i porto sempre al cor **Mireia, Lili, Nacho, Cris, Helena, Albert, Txell, Laura, Inma i Lúdia**. Al campus de Bellvitge, al Clínic, al Fru, a totes les innumbrables estones compartides i les que ens queden per endavant, gràcies cooperativa! I aquí, faig també un incís distintiu als companys de pis per fer omplir de bonics records aquesta època **Ignasi, Aleix, Paula, Alberto, Gerard, Albert, Fàtima, Adrià, Pep, Karla, Marina i Joan**.

I finalment, gràcies a la meva família, en especial a la meva **mare** i al meu **pare** a qui dedico aquesta tesi, per la vostra valentia, estima i suport incondicional. A la iaia **Carme**, a l'avi **Lluís** i a la iaia **Palmira**, als cosins i als tiets. I també a una persona molt especial, en **Jordi**, per fer-me gaudir de la vida al seu costat, pel seu suport, i l'alegria i felicitat que em contagia quan estem plegats.





## SINOPSI

Human noroviruses (HuNoV) are recognized as one of the main etiological agents causing acute gastroenteritis, being directly responsible for the 17-18% of the total cases and affecting all age groups. As an enteric virus with fecal-oral transmission, HuNoV is also a highly relevant virus in the field of public health and food safety.

Outbreaks caused by HuNoV are particularly common in closed and semi-closed settings such as hospitals, nursing homes and schools. Epidemiological surveillance of HuNoV is not systematically performed and the total number of cases among the population may be underestimated. Molecular characterization of different genotypes associated with outbreaks provides information of the geographic and temporal distribution of HuNoV genotypes, and enhances the understanding of viral features which may affect HuNoV pathology and transmission. In this work, we characterized the circulating HuNoV genotypes among Catalan population causing outbreaks in different settings during a 3-year period (2017-2019), and correlated them with epidemiological data collected during outbreak investigations (mainly setting, type of transmission, season, attack rate, outbreak size and duration, and symptom information for affected individuals).

HuNoV is routinely diagnosed by the molecular analysis of feces, although its presence has been also identified in the oral cavity. This hypothetic new diagnostic approach would be more attractive and alternative for its detection, making the sampling easier, faster and less invasive and risky. In these thesis, the occurrence of HuNoV in saliva of affected individuals was studied from a subset of outbreaks, and its correlation with clinical data regarding symptoms and other several individual characteristics were analyzed.

Finally, a common route of acquiring HuNoV infection is through the consumption of contaminated food, especially if eaten raw or undercooked, or even if associated with the transfer of viral particles during food preparation by people who are in a period of shedding. Apart from bivalve mollusks, fruits and vegetables are increasingly being recognized as potential vehicles for their transmission, which can be contaminated at any point in the production chain. Therefore, proper washing treatments before consumption would be a major step in reducing viral particles in foods to mitigate risk of HuNoV transmission. The results of our work confirm the suitability of different disinfectants to reduce HuNoV contamination in vegetables and its proper application in the food industry. Moreover, they could also be potentially used in private homes, as well as in catering services, where implementation of food sanitizers should be strengthened.

## TAULA DE CONTINGUTS

Llistat d'abreviatures .....	- 13 -
1. Els Norovirus Humans .....	- 19 -
1.1. Aspectes bàsics.....	- 19 -
1.2. Perspectiva històrica: l'agent de Norwalk.....	- 20 -
1.3. La família <i>Caliciviridae</i> .....	- 22 -
1.4. Virologia molecular i cel·lular .....	- 22 -
1.4.1. Organització genòmica.....	- 22 -
1.4.1.1. Proteïnes estructurals .....	- 24 -
1.4.1.2. Proteïnes no estructurals.....	- 26 -
1.4.2. Cicle replicatiu .....	- 28 -
1.5. Diversitat genètica i classificació .....	- 31 -
1.5.1. Classificació i nomenclatura.....	- 31 -
1.5.2. Variabilitat genètica i evolució .....	- 35 -
1.6. Susceptibilitat a la infecció: lligands d'unió de norovirus.....	- 37 -
1.6.1. El rol dels HBGA.....	- 37 -
1.6.2. Lligands d'unió diferents d'HBGA.....	- 43 -
1.7. Epidemiologia .....	- 45 -
1.7.1. Vies de transmissió.....	- 46 -
1.7.1.1. Higiene personal.....	- 47 -
1.7.1.2. Transmissió alimentària.....	- 48 -
1.7.1.3. Contaminació ambiental .....	- 51 -
1.7.1.4. Transmissió no fecal-oral.....	- 52 -
1.7.2. Brots epidèmics .....	- 53 -
1.7.3. Casos esporàdics .....	- 53 -
1.7.4. Infeccions asimptomàtiques.....	- 54 -
1.8. Detecció de HuNoV a la saliva.....	- 55 -
1.9. Diagnòstic .....	- 57 -
1.9.1. Diagnòstic molecular.....	- 57 -

1.9.2. Mètodes estandarditzats d'anàlisi d'aigües i aliments.....	- 58 -
1.9.3. Correlació amb infectivitat.....	- 59 -
1.10. Prevenció i control.....	- 61 -
1.10.1. Mesures per part de les indústries alimentàries.....	- 62 -
1.10.1.1. Mol·luscs bivalves.....	- 62 -
1.10.1.2. Fruïtes i verdures.....	- 63 -
1.10.2. Mesures a mans del públic general i consumidors.....	- 65 -
1.10.2.1. Higiene i desinfecció.....	- 65 -
1.10.3. Mesures per part de les autoritats competents.....	- 67 -
1.10.4. Vacunació.....	- 72 -
Objectius.....	- 77 -
Informe dels articles.....	- 81 -
1. Llistat d'articles inclosos a la tesi.....	- 81 -
2. Informe de coautoria dels articles publicats.....	- 83 -
Article I: Epidemiological and genetic characterization of Norovirus outbreaks occurred in Catalonia, Spain, 2017-2019.....	- 87 -
Article II: Detection of norovirus in saliva samples from acute gastroenteritis cases and asymptomatic subjects: association with age and higher shedding in stool.....	- 109 -
Article III: Effectiveness of consumers washing with sanitizers to reduce human norovirus on mixed salad.....	- 129 -
Discussió general.....	- 143 -
Conclusions.....	- 169 -
Referències.....	- 175 -
Annex.....	- 227 -

## Llistat d'abreviatures

<b>°C</b>	Graus centígrads
<b>(+)RNA</b>	Àcid ribonucleic de polaritat positiva
<b>(-)RNA</b>	Àcid ribonucleic de polaritat negativa
<b>ABO</b>	Sistema de grups sanguinis ABO humans
<b>ACSA</b>	Agència Catalana de Seguretat Alimentària
<b>AdV</b>	Adenovirus
<b>APPCC</b>	Anàlisi dels perills i punts de control crítics
<b>ASPB</b>	Agència de Salut Pública de Barcelona
<b>ASPCAT</b>	Agència de Salut Pública de Catalunya
<b>AstV</b>	Astrovirus
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CDNA</b>	Communicable Diseases Network Australia
<b>CE</b>	Comissió Europea
<b>cg</b>	Còpies genòmiques
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>eIF3</b>	Factor d'iniciació eucariota 3
<b>EPI</b>	Equip de protecció individual
<b>EUA</b>	Estats Units d'Amèrica
<b>EV</b>	Enterovirus
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FUT</b>	Fucosil transferasa
<b>FCV</b>	Calicivirus felí
<b>G(n)</b>	Genogrup
<b>GEA</b>	Gastroenteritis aguda
<b>GNA</b>	Genogrup no assignat
<b>HAV</b>	Virus de l'Hepatitis A



<b>HBGA</b>	Histo-blood group antígen (antígen del grup histosanguini)
<b>HPP</b>	High-pressure processing (tractament d'alta pressió)
<b>HuNoV</b>	Norovirus humà
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>ISO</b>	International Standardization for Organization
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Litre
<b>le</b>	Lewis
<b>log</b>	Logaritme
<b>mg</b>	Mil·ligram
<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>MuNoV</b>	Norovirus murí
<b>NCWG</b>	Norovirus Classification Working Group
<b>NLV</b>	Norwalk-like virus
<b>nm</b>	Nanòmetres
<b>nt</b>	Nucleòtid
<b>NoV</b>	Norovirus
<b>NTP</b>	Nucleosina trifosfat
<b>ORF</b>	Open reading frame (pauta oberta de lectura)
<b>PAA</b>	Àcid peracètic
<b>pb</b>	Parell de bases
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (reacció en cadena de la polimerasa)
<b>PHE</b>	Public Health England
<b>PMA</b>	Propidium monoazide (monoazida de propidi)
<b>poliA</b>	Poliadenilat
<b>p/p</b>	Persona a persona
<b>ppm</b>	Part per milió

<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction (reacció en cadena de la polimerasa quantitativa)
<b>RASFF</b>	Rapid Alert System for Food and Feed
<b>RdRp</b>	RNA-dependent RNA polymerase (RNA polimerasa - RNA dependent)
<b>RHDV</b>	Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (Virus de la malaltia hemorràgica dels conills)
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RT</b>	Retrotranscripció
<b>RTE</b>	Ready-to-eat (llestes per consumir)
<b>RV</b>	Rotavirus
<b>SaV</b>	Sapovirus
<b>Se</b>	Secretor
<b>SRSV</b>	Small round structured virus (petits virus rodons estructurats)
<b>THM</b>	Trihalometans
<b>TV</b>	Tulane virus
<b>UE</b>	Unió Europea
<b>UVE</b>	Unitat de Vigilància Epidemiològica
<b>VLP</b>	Virus-like particle (partícula pseudo-vírica)
<b>VN</b>	Virus de Norwalk
<b>VPg</b>	Viral protein genome-linked (proteïna viral lligada al genoma)
<b>WHO</b>	World Health Organization



# INTRODUCCIÓ



## 1. Els Norovirus Humans

### 1.1. Aspectes bàsics

Els norovirus humans (HuNoV) són reconeguts per ser un dels principals agents etiològics que provoca gastroenteritis aguda (GEA) entre la població, essent-ne el responsable directe en aproximadament 1 de cada 5 casos (1, 2).

S'estima que el nombre d'infeccions causades per HuNoV a nivell global és de 699 milions i de 219.000 el nombre de morts associades cada any, resultant un problema tant per països amb alts com baixos ingressos econòmics (2, 3).

Els HuNoV genogrup I (GI) i genogrup II (GII) són responsables d'haver causat diverses pandèmies i del 50-70% dels brots de GEA reportats pels sistemes de vigilància, essent les institucions com centres de salut d'atenció prolongada, geriàtrics o centres educatius les més afectades (4-6).

La principal simptomatologia és el desencadenament a través de vòmits, diarrea aquosa, nàusees i dolor abdominal, que també pot anar acompanyada de febre i dolors musculars; malgrat que també existeixen infeccions asimptomàtiques. La principal via de transmissió del virus és la ruta fecal-oral excretant-se en quantitats elevades a través de la femta i vòmit (7, 8).

En adults en bon estat de salut les infeccions per HuNoV tendeixen a ser, si bé debilitants, de curta durada (d'hores a dies) i de resolució espontània. Però hi ha col·lectius que en resulten més vulnerables com els nens de fins a 5 anys, la població més envellida i les persones immunodeprimides (9-12). Ambdós darrers grups es caracteritzen per

poder desencadenar infeccions persistents durant mesos o fins i tot anys (13, 14).

Una de les característiques més importants de HuNoV n'és la seva elevada transmissibilitat, proporcionada per una baixa dosi mínima infecciosa estimada entre 18-1000 partícules víriques (15, 16). També gaudeix d'una alta estabilitat ambiental i és la primera causa de malaltia de transmissió alimentària, principalment a través de marisc, fruites i verdures (6, 17, 18).

Actualment no es disposa de vacunes aprovades o antivirals específics per prevenir les infeccions causades per HuNoV. I el fet de no comptar amb sistemes cel·lulars prou robustos i econòmicament abastables per a la seva propagació en dificulta el seu estudi (19).

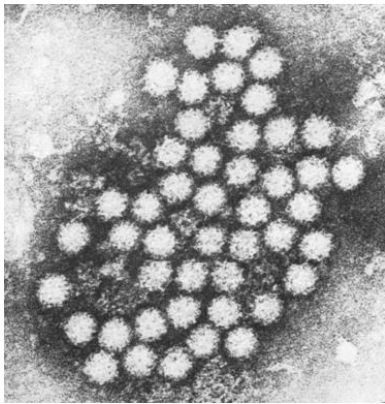
### **1.2. Perspectiva històrica: l'agent de Norwalk**

J. Hahorsky és la primera referència que tenim a l'actualitat sobre la malaltia causada pel gènere *Norovirus* en humans. L'any 1929 va introduir el terme "winter vomiting disease" (malaltia del vòmit d'hivern), fent èmfasi a dues característiques de la infecció: els infectats presentaven vòmit com a símptoma principal, i la gran majoria de casos eren reportats durant els mesos d'hivern, caracteritzant la malaltia per un patró estacional (20).

No va ser fins l'any 1972 arran d'un brot de gastroenteritis a l'octubre de 1968 a la Bronson Elementary School, de la ciutat de Norwalk, Ohio, EUA, que Albert Kapikian va visualitzar un petit virus, que per la seva morfologia el va incloure dins del grup heterogeni dels "small-round structured virus" (SRSV) (21). El brot va caracteritzar-se per tenir un ampli abast d'afectació, atès que segons es troba documentat va

involucrar fins al 50% d'alumnes i professors i a un 32% dels seus contactes; amb la presència de nàusees i vòmits com a símptomes més freqüents manifestats en un 80% dels afectats (22).

A partir d'escovillons rectals dels individus afectats per aquest brot van produir-se filtrats lliures de bacteris, que conjuntament incubats amb sèrum de voluntaris convalsents, van permetre a Kapikian observar per primera vegada les partícules víriques de HuNoV mitjançant microscòpia immunoelèctrica. Va descriure'ls com a agregats brillants no embolcallats, recoberts d'anticossos i d'un diàmetre aproximat de 27-nm (**Figura 1**) (21).



**Figura 1.** Partícules del Virus de Norwalk (VN) visualitzades per microscòpia immunoelèctrica. Imatge extreta de (24).

Posteriorment, a aquest virus se'l va passar a anomenar com a Virus de Norwalk (VN) fent referència a la ciutat on havia estat descrit. Va esdevenir també el genotip tipus o de referència del grup de virus creat per aglutinar els denominats "Norwalk-like viruses" (NLV), virus afins al virus de Norwalk; grup al que es van incorporar el virus de Hawaii arran d'un brot familiar de gastroenteritis a Honolulu el 1971, i del virus Snow Mountain, identificat a un campament del Colorado al 1976 (23). A partir



dels NLV, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) va crear el 2002 el gènere *Norovirus* (NoV).

### 1.3. La família *Caliciviridae*

La família *Caliciviridae* està formada per virus caracteritzats per ser de mida petita d'entre 27-40 nm aproximadament, d'estructura icosaèdrica, sense embolcall lipídic i per contenir una molècula d'RNA monocatenari de polaritat positiva. Aquesta família inclou el gènere *Norovirus*, però n'hi hauria fins a 10 més descrits; aquets són: *Sapovirus* (SaV), *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus* *Vesivirus*, *Valovirus* (infecten mamífers), *Bavovirus* i *Nacovirus* (infecten ocells) i *Minovirus* i *Salovirus* (infecten peixos). També s'han detectat en serps i granotes, posant de manifest l'ampli rang d'hostes que poden estar afectats pels calicivirus (24).

Els principals patògens humans de la família *Caliciviridae* són els HuNoV i SaV causants de GEA. En animals, són especialment d'interès el vesivirus anomenat calicivirus felí (FCV) responsable d'afectacions respiratòries, i el lagovirus de la malaltia hemorràgica del conill (RHDV).

### 1.4. Virologia molecular i cel·lular

#### 1.4.1. Organització genòmica

El genoma dels HuNoV té una mida aproximada d'entre 7.5-7.7 kb i està organitzat en tres pautes obertes de lectura (open reading frame, ORF): ORF1, ORF2 i ORF3 (**Figura 2A**). Compta també amb la presència d'RNA



l'assemblatge, ja que a les cèl·lules infectades es produeixen més còpies de l'RNA subgenòmic que no pas de l'RNA genòmic (27).

El genoma dels HuNoV també conté regions no codificants. Tot i que són típicament curtes, aquestes estructures estan implicades en les fases de replicació, traducció i patogenicitat del virus (28, 29).

Si utilitzem com a referència el VN, el primer genoma seqüenciat de HuNoV, s'observa que està format per 7,654 kb on el fragment codificant més llarg correspon a l'ORF1 (nt. 5-5,374), seguidament de l'ORF2 (nt. 5,358-6,949), superposat en els últims nucleòtids amb l'ORF1, i l'ORF3 (nt. 6,950-7,588). A l'extrem 3' apareix una zona d'uns 65 nt poliA (**Figura 2A**).

L'estudi de les funcions del conjunt de proteïnes de HuNoV i el paper que desenvolupen en la replicació del virus encara no gaudeix d'una clara explicació a causa d'una absència de models animals o d'un cultiu cel·lular eficient. A continuació se'n detallen algunes de les seves característiques principals.

### **1.4.1.1. Proteïnes estructurals**

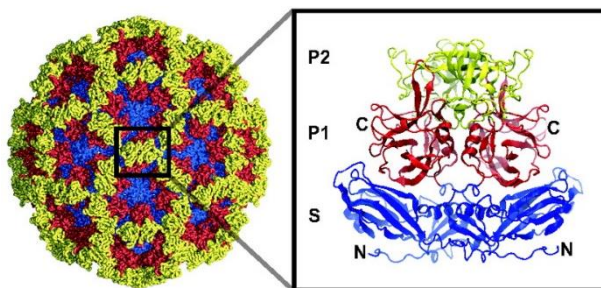
La proteïna VP1 (58kDa) és el principal polipèptid estructural de la càpsida de HuNoV, composta per 90 dímers (180 còpies) de VP1 assemblats en una simetria icosaèdrica de tipus T=3. Desenvolupa un paper fonamental en la determinació del fenotip antigènic del virus i en la interacció amb la cèl·lula hoste (30, 31).

S'hi poden distingir el fragment de la càpsida o "shell" (S) i el protuberant (P). El fragment S està format per dos dominis, l'extrem N que es troba ubicat dins de la càpsida on la seva funció és unir els

dímers de la proteïna VP1; i el domini S, que constitueix la part més conservada de la proteïna i que dóna forma a la part interna de la càpsida rodejant-ne l'RNA, tenint un rol en l'assemblatge del virus (32).

A la **Figura 2D** s'observa que la proteïna VP1 està composta per 530 aminoàcids. Al fragment S s'hi distingeixen el domini N ocupant els residus 1-49 i el domini S del 50-218. La regió frontissa està formada pels residus 219-225 i finalment apareix el domini P, format pels residus 226 al 530, i dividit en les regions P1 (residus 226-278/406-530) i P2 (residus 279-405).

Per la seva part, el fragment P, unit a S a través de la regió frontissa és l'encarregat de formar les protuberàncies en forma d'arc que contribuiran tant en la mida com en l'estabilitat de la càpsida (31). Alhora es troba dividit en dos dominis, el P1, que forma els costats dels arcs per col·locar el domini P2 a la més externa del virió (**Figura 3**).



**Figura 3.** Cristal·lografia de rajos X de l'estructura del VN (imatge esquerra). Apareix representada la proteïna VP1 on es poden distingir els dominis N i S en blau, el domini P1 en vermell i el domini P2 a la part més externa del virus en groc (imatge dreta) Imatge extreta de (31).

El domini P2 està caracteritzat per ser altament variable i per contenir els llocs d'unió als complexos majors d'histocompatibilitat HBGA (Histo-Blood Group Antigens) i possiblement també a altres tipus de receptors.

Està subjecte a una elevada pressió selectiva que condueix a les partícules víriques a noves mutacions per tal d'escapar-se de la resposta immunitària de l'hoste (31, 33, 34).

Per la seva part, la proteïna VP2 es considera una proteïna estructural menor perquè es troba en menys quantitat en les partícules del virió (35). Aquesta proteïna té una massa molecular de 29 kDa i es troba localitzada específicament a l'interior de la partícula. Constitueix una de les proteïnes menys estudiades de HuNoV tenint un rol en l'assemblatge i l'estabilitat de la càpsida. Tanmateix, durant la replicació també regula positivament l'expressió de VP1 modulant l'activitat de la RdRp i l'encapsidació del genoma (36).

### **1.4.1.2. Proteïnes no estructurals**

Les proteïnes no estructurals resulten de l'escissió proteolítica d'una poliproteïna gran d'aproximadament 200 kDa codificada per l'ORF1 (37), tot i que aquest precursor mai s'ha observat probablement perquè el mecanisme de processament proteolític és ràpid i co-traduccionat (38). Per tal de conèixer la seva implicació en el cicle biològic entre elles s'hi troba:

- p48: és una proteïna característica de 37 kDa en GI i d'entre 45-48 kDa en GII localitzada a l'extrem 5' de la poliproteïna. Obstaculitza el funcionament normal de la cèl·lula hoste interferint en les vies d'apoptosi a través del reticle endoplasmàtic, així com en l'activació de vies de resposta del sistema immunitari com és la producció de citocines (39, 40).

- NTPase/RNA helicasa: les seves funcions estan relacionades amb disposar d'activitat helicasa dependent d'ATP sobre les cadenes d'RNA, en participar en la síntesi d'RNA conjuntament amb la RdRp i en la hidròlisi de nucleòtids trifosfats (40, 41). Per altra banda també es troba descrita una activitat tipus xaperona (40).
- p22: actua interferint en la secreció de proteïnes i en la senyalització a l'aparell de Golgi (42). Està també implicada en la resposta immunitària alterant els nivells d'interferó i citocines després de la infecció viral, tenint un paper crucial en la patogènesi i la replicació del virus (43). Se'n descriu també una modulació del citoesquelet d'actina que condueix a la disfunció de la cèl·lula (44). I a més, afavoreix l'assemblatge del complex de replicació format entre p48 i NTPase (40).
- VPg: es troba covalentment unida a l'RNA genòmic i subgenòmic del virus per l'extrem 5'. Encara que aquesta proteïna estigui present en el virió, funciona com una proteïna no estructural durant la replicació. En l'estructura genòmica de l'RNA del virus no hi apareix cap lloc d'unió al ribosoma, de manera que la proteïna VPg actuaria com iniciador de la traducció unint-se al factor d'iniciació eIF3 per dirigir la síntesi proteica (45, 46).
- Proteasa: pertany a la família de les serina proteases. La seva funció principal és la de participar en l'escissió de la poliproteïna, a través de diversos talls proteolítics que donaran lloc a les proteïnes no estructurals del virus (47). Se li distingeixen dos tipus de talls proteolítics, els primers i més eficients entre p48/NTPase i

NTPase/p22, i els darrers i menys eficients entre p22/VPg, VPg/Pro i Pro/RdRp (48).

- RNA polimerasa – RNA dependent (RdRp): participa en la transcripció de l'RNA del virus (49).

### 1.4.2. Cicle replicatiu

Els HuNoV inicien la infecció de l'hoste amb l'entrada del virus a través de la ingestió. Les partícules víriques són estables en ambients àcids, característica que els permet sobreviure durant el trànsit a través de l'estómac, i arribar al teixit diana principal, l'intestí. Aquí hi tindria lloc la replicació vírica a gran escala, on posteriorment abandonaran el tracte gastrointestinal de l'hoste amb les femtes.

El cicle replicatiu dels HuNoV és ràpid, detectant-se una nova progènie viral en poques hores després de la infecció. La seva estratègia de replicació comparteix moltes característiques amb la d'altres virus RNA de cada senzilla i polaritat positiva (19).

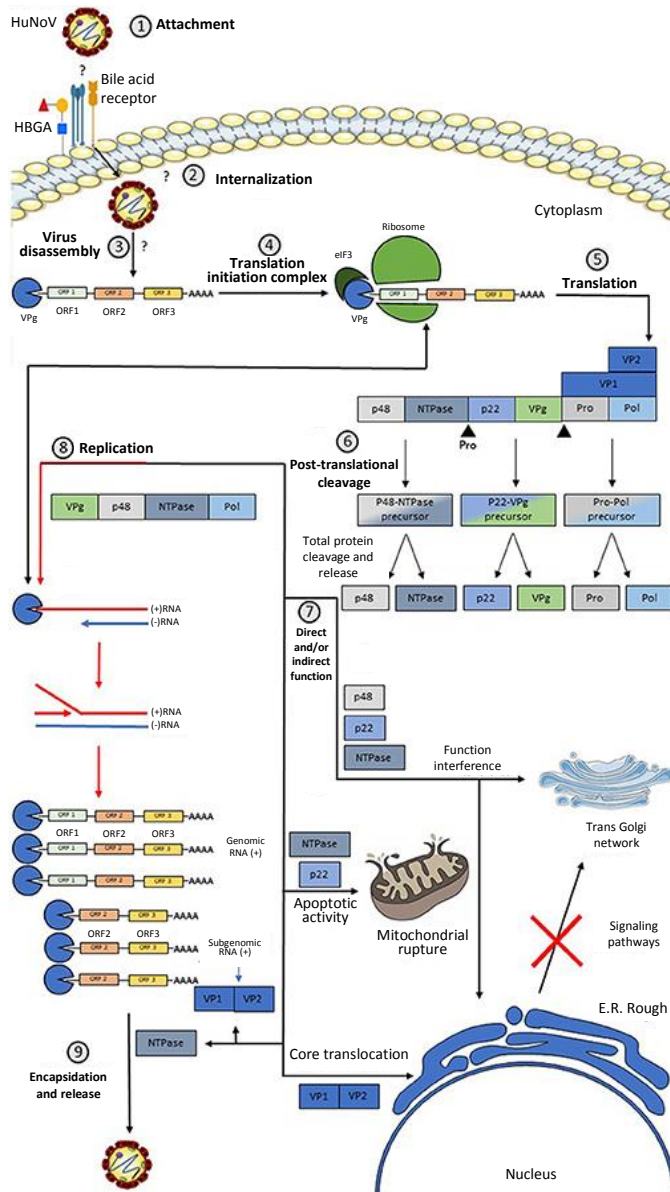
Una vegada es produeix la interacció del domini P2 de la proteïna VP1 del virus amb la cèl·lula diana a través del/s receptor/s cel·lulars es produeix la internalització del virus i la desencapsidació alliberant l'RNA al citoplasma (el mecanisme pel qual es produeixen aquests dos últims passos no resulta clar). Una vegada alliberat, la proteïna VPg interaccionarà amb el factor d'iniciació de la traducció cel·lular eIF3 generant el complex d'iniciació de la traducció (46). Posteriorment, les subunitats majors i menors del ribosoma seran reclutades resultant en la traducció de la poliproteïna no estructural del virus (50). Una vegada estigui generada, la proteasa s'escindeix automàticament i co- i post-

traduccionament talla la resta de la poliproteïna, generant tres precursors proteïcs: p48/NTPase, p22/VPg i Pro/RdRp. Consecutivament, els tres precursors seran escindits en les sis proteïnes individuals que presentaran funcions en els cicles replicatius i infectius posteriors.

Per altra banda, la replicació es durà a terme per l'acció de les proteïnes RdRp, VPg i NTPase, tot i que p48 també s'integrarà en aquest procés augmentant l'activitat de la RdRp (51). A continuació es durà a terme la síntesi del genoma viral i de l'RNA subgenòmic, i una vegada la poliproteïna i les dues proteïnes estructurals VP1 i VP2 s'han generat, l'assemblatge i la sortida dels virions tindrà lloc a través de mecanismes que encara resulten per clarificar (52, 53).

Mentre el procés de transcripció anterior es duu a terme, la proteïna p48 migrarà cap al reticle endoplasmàtic i cap al trans-Golgi per promoure'n el seu desmuntatge, causant interferències en les vies de senyalització NFkB, MAPK i PI3K-Akt, importants per la resposta immunològica. I també participarà a través de la via SNARE per alterar el transport vesicular (43, 54). L'efecte de la proteïna p48 serà reforçat per l'acció de p22 que sinèrgicament contribuirà al desmuntatge de la xarxa trans-Golgi i al bloqueig del trànsit de les vesícules COPII (42). Al seu torn, les proteïnes p22 i NTPase promouran vies de senyalització pro-apoptòtiques de la cèl·lula per tal de facilitar la sortida del virus de la cèl·lula (**Figura 4**) (27, 53).





**Figura 4.** Cicle biològic dels HuNoV. Les partícules s'uneixen a la superfície cel·lular a través dels respectius lligands (1). Entrada del virus a la cèl·lula (2). Desencapsidació del virus (3). El genoma es tradueix a través d'interaccions amb VPg per l'extrem 5' (4). Es produeix la síntesi de les proteïnes estructurals i no estructurals (5). La poliproteïna es divideix en tres precursors per acabar donant lloc a sis proteïnes no estructurals (6). Alteració i bloqueig en vies de senyalització cel·lular (7). Replicació de l'RNA (8). L'RNA s'empaquetarà i es produirà la sortida del virus (9). Imatge extreta i adaptada de (19).

## 1.5. Diversitat genètica i classificació

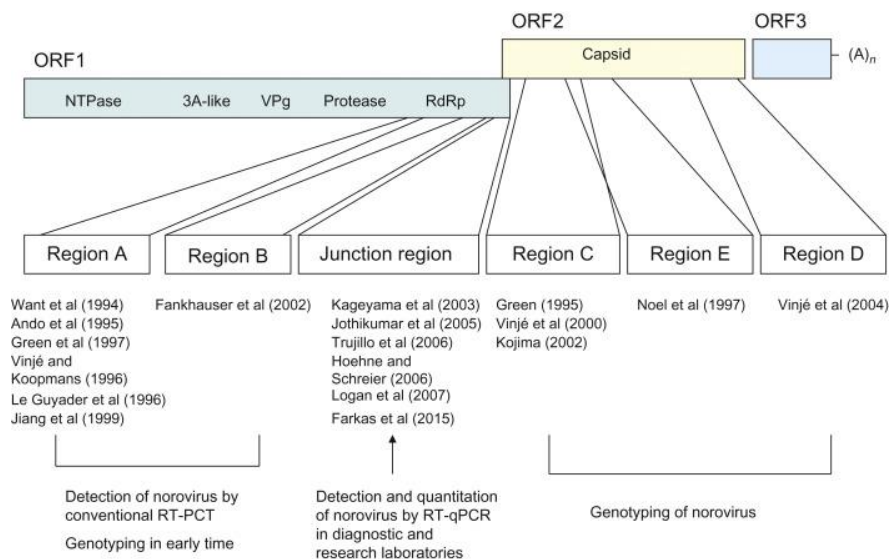
### 1.5.1. Classificació i nomenclatura

El gènere *Norovirus* conforma un grup genèticament molt divers que afecta un ampli rang d'espècies de mamífers diferents: humans, gossos, gats, porcs, ratolins, ovelles i vaques (55–58). Recentment també s'ha identificat en rat-penats, lleons marins i marsopes (59–61).

La necessitat d'organitzar les soques de norovirus en diversos grups o clústers va sorgir a mitjans dels anys 90, moment on van començar-se a classificar en genogrups i genotips segons el segment de la RdRp (62, 63). Però a mesura que la diversitat de seqüències augmentava, es va decidir canviar el model de classificació, ara basant-se en la seqüència completa d'aminoàcids de la proteïna VP1 (64).

Diferents regions del genoma s'han utilitzat de manera més o menys estandarditzada en el passat per a dur a terme la seva detecció o genotipatge, en són exemples 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 de la VP1. D'aquestes, la regió C va ser altament emprada (**Figura 5**) (65).

L'any 2013, investigadors pertanyents al Norovirus Classification Working Group (NCWG) van actualitzar la nomenclatura de classificació i el sistema de genotipatge perquè fos utilitzat com a estàndard internacional. El motiu del canvi va ser novament la descripció de més seqüències de la RdRp i de la VP1 desconegudes fins el moment que restaven orfes de classificació (66). Així, els HuNoV es van agrupar en sis genogrups coneguts com a GI-GVI, amb un setè genogrup pendent de confirmació (GVII), i subdividits en més de 40 genotips (17).



**Figura 5.** Esquema de les posicions del genoma de HuNoV més emprades per a la seva detecció i genotipatge. Imatge extreta de (65).

Atès que és un gènere que presenta una elevada capacitat de recombinació, essent majoritàriament a la regió situada entre els fragments ORF1 i ORF2 (67, 68); la diversitat de noves soques circulants es representa actualment amb informació relativa tant de les proteïnes RdRp i VP1. Aquest enfoc amb tipatge dual permet representar les formes recombinats i permetre un millor seguiment i evolució de les soques de HuNoV (69).

Recentment, amb la descripció de més seqüències, i utilitzant el mateix mètode de classificació establert per NCWG, Chhabra *et al.* van reformular-ne la classificació al 2019. Es va proposar una expansió de fins a deu genogrups (GI-GX) que ha estat acceptada per l'ICTV (70), amb l'existència de dos d'extres pendents de confirmació (seran candidats fins que no hi hagi disponibles almenys dues seqüències completes i idèntiques de la proteïna VP1 aïllades en punts geogràfics diferents). Dins dels deu genogrups s'hi descriuen 49 seqüències de la

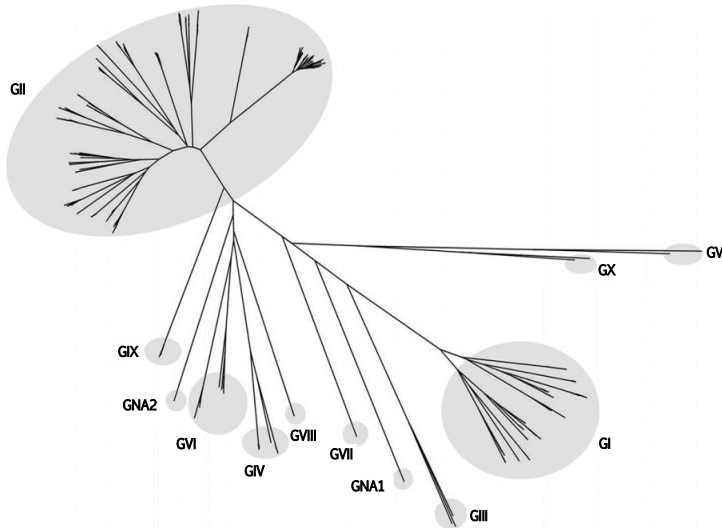
proteïna VP1 i 60 seqüències de nucleòtids parcials de la regió de la RdRp (71).

D'aquests 10 genogrups descrits, GI, GII, GIV, GVIII i GIX infecten humans, tot i que principalment els GI i GII són els responsables de pràcticament totes les infeccions humanes a nivell global (2, 69, 72). Pel que fa a la resta d'hostes, alguns genotips de GII també infecten a espècies porcines, el genogrup GIII a espècies bovines i ovines, el GV a espècies murines, els GIV i GVI tant a canines com felines, el GVII solament a canines i el GX a rat-penats. Els genogrups que es troben pendents de confirmació són els aïllats en lleons marins i marsopes que corresponen a GNA1 i GNA2 (genogroup non-assigned) respectivament (**Figura 6**).

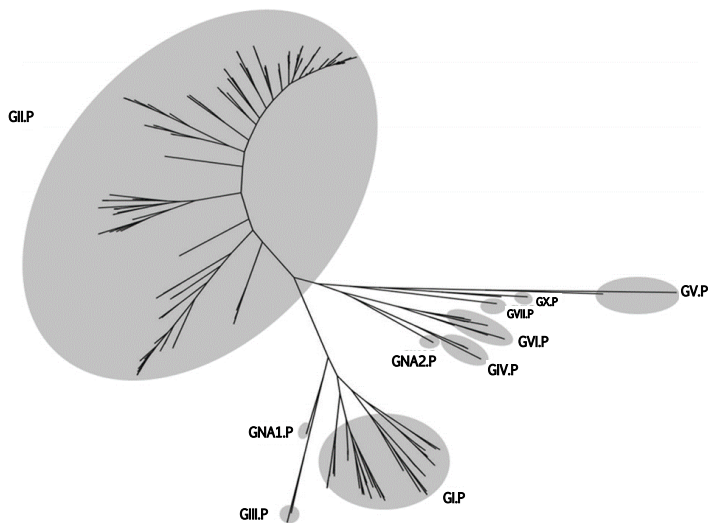
Per tal de distingir entre la classificació de la proteïna VP1, la nomenclatura de les seqüències referent al genotip de la RdRp s'estableix indicant-ho amb una "P". La classificació es basa en el tipatge parcial de la seqüència de la RdRp d'aproximadament 750-800 pb de l'extrem 3'. Actualment s'han descrit fins a 8 genotips "P" anomenats com a GI.P-GVII.P i GX.P, i dos que resten pendents de confirmació anomenats GNA1.P i GNA2.P (**Figura 7**).

Aquesta numeració dels genotips de la RdRp no segueix la mateixa esmentada anteriorment per la proteïna VP1, ja s'estableix una relació de proximitat entre clústers independent (per exemple, les RdRp dels genotips GVIII i GIX estableixen un clúster conjunt amb les de GII.P) (71). La nomenclatura dual per una correcta classificació de les seqüències de norovirus representa la informació d'ambdós fragments, tant del tipus de la RdRp com de la proteïna VP1. Així, els genotips de norovirus es representaran segons la modalitat següent: Genogrup.genotip[GrupP.TipusP]. Per exemple, el genotip GII.2[GII.P16]

refereix a un virió que la seva VP1 pertany al GI i genotip II, i la seva RdRp al GI tipus 16.



**Figura 6.** Classificació dels NV en 10 genogrups representats com a GI-GX i els dos genogrups pendents de confirmació com a GNA1 i GNA2, basats en la diversitat de la seqüència completa de la proteïna de la càpsida VP1. Imatge extreta de (71).



**Figura 7.** Classificació dels NV en 8 genogrups representats com a GI.P-GVII.P i GX.P i dos genogrups pendents de confirmació com a GNA1.P i GNA2.P, basats en la diversitat de la seqüència parcial de la RdRp. Imatge extreta de (71).

Un dels altres sistemes de classificació que inclou una codificació més completa i que és emprat per plataformes com GenBank és:

Organisme/hoste/codi del país (ISO)/any/genotip[Tipus]/nom

Com a exemple tindríem:

NorovirusGI/Hu/US/1968/GI.1[GI.P1]/Norwalk.

La nomenclatura actualitzada amb els nous genogrups i genotips incloent els tipus de polimerasa està disponible també a les eines de tipatge online de NoV: Norovirus Typing Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) (73).

### 1.5.2. Variabilitat genètica i evolució

El reconeixement de l'impacte de HuNoV en salut pública ha motivat la creació de xarxes de vigilància locals i regionals per monitoritzar-ne l'activitat. S'encarreguen de recollir informació sobre l'epidemiologia dels brots, les fonts d'origen i d'estudiar-ne l'impacte, així com conèixer els genotips de HuNoV que circulen al llarg del temps entre la població (6, 74). Aquest fet permet descobrir diferències en la clínica i en la transmissió associades a un genotip concret, a més d'il·lustrar els patrons evolutius distintius de HuNoV (6, 66, 74, 75).

L'ús del genotipatge resulta un indicador epidemiològic global per HuNoV. Des de mitjans del 1990 el GI.1 genotip 4 (GI.1.4) és el més predominant i el que més circula globalment (76). També és l'únic que s'ha classificat en variants, que cada dos o tres anys des de 1995 se'n descriu una de nova emergent que reemplaça l'anterior. La primera variant en caracteritzar-se va ser la US95\_96, seguidament de Farmington\_Hills\_2002, Asia\_2003, Hunter\_2004, Yerseke\_2006, Den

Haag\_2006b, New Orleans\_2009 i fins l'actual Sydney\_2012 (77, 78). Aquestes variants han causat pandèmies globals i temporades amb un intens nombre de casos i brots, amb un augment fora dels mesos més freds de l'any.

Però per primera vegada en 20 anys, a la Xina i al Japó la variant GII.4 Sydney 2012 va ser desplaçada per un nou genotip de GII.17[GII.P17] durant l'hivern del 2014-2015. El genotip conegut com a Kawasaki 2014 exhibia una altra RdRp no descrita fins al moment, la GII.P17, resultant en un gran impacte en casos i brots (79-81). Posteriorment, la seva incidència a nivell global no hauria seguit aquesta tendència observada als països asiàtics, tot i que constitueix un genotip freqüentment detectat, com també ho són GII.2, GII.3 i GII.6. Per altra banda, les infeccions pel GI tenen una incidència menor, i essent rarament detectables les causades pels GIV, GVIII i GIX (82-86). La prevalença d'anticossos entre la població també sembla ser major per GII que no pas per GI, fet que permet recolzar el predomini de les soques circulants de GII (87, 88).

Des del 2015 la variant de GII.4 Sydney 2012 ha incorporat una nova RdRp, la tipus GII.P16, a diferència de la GII.P4, o de les seves formes evolutivament més properes GII.P31 i GII.P12 recombinades en anteriors variants (68). Aquest nou genotip GII.4[P16] Sydney 2012 descrit als EUA va representar fins al 60% dels brots descrits durant l'hivern del 2015-2016 (74). El motiu pel qual aquest genotip és ja tan prevalent globalment es deu al fet que hauria incrementat el seu fitness, conduint a diferències en la replicació i transmissió (89, 90). De la mateixa manera, un altre dels genotips recombinants amb la RdRp GII.P16 i més prevalents és també el GII.2, detectat a Alemanya el 2016 arran d'haver-

se duplicat durant aquell hivern els casos de HuNoV respecte l'any anterior (91).

Abans que un genotip es converteixi en pandèmic sol circular diversos anys entre la població, i per això, una vigilància prematura contribueix a reduir la càrrega global de la malaltia (92, 93). I també, resulta un requisit a tenir en compte en la producció de vacunes (94).

## **1.6. Susceptibilitat a la infecció: lligands d'unió de norovirus**

L'ésser humà presenta, en general, una elevada susceptibilitat a les infeccions i malaltia causada per HuNoV, però no tots els individus en presenten el mateix grau (95, 96). La primera evidència d'aquesta particularitat va ser l'estudi del primer brot descrit de HuNoV a la ciutat de Norwalk, on el 50% dels individus exposats no van desenvolupar símptomes (22). Posteriorment aquest fet també s'evidenciaria en altres brots, així com en estudis amb voluntaris humans (95, 97, 98), atribuït a la presència de factors propis en l'hoste que provocarien diverses respostes a la malaltia. D'aquesta manera, les interaccions per HuNoV són virus-hoste heterogènies.

### **1.6.1. El rol dels HBGA**

Un factor que juga un paper clau a l'hora de determinar la susceptibilitat a la infecció per HuNoV són els HBGA. Diversos estudis han corroborat la unió entre la partícula vírica i els HBGA (99, 100) malgrat que el rol que té aquesta interacció en el cicle d'infecció és encara poc conegut. S'especula que funcionarien com a receptors/coreceptors del virus, o bé com a factors d'adhesió que facilitarien la interacció del virus amb



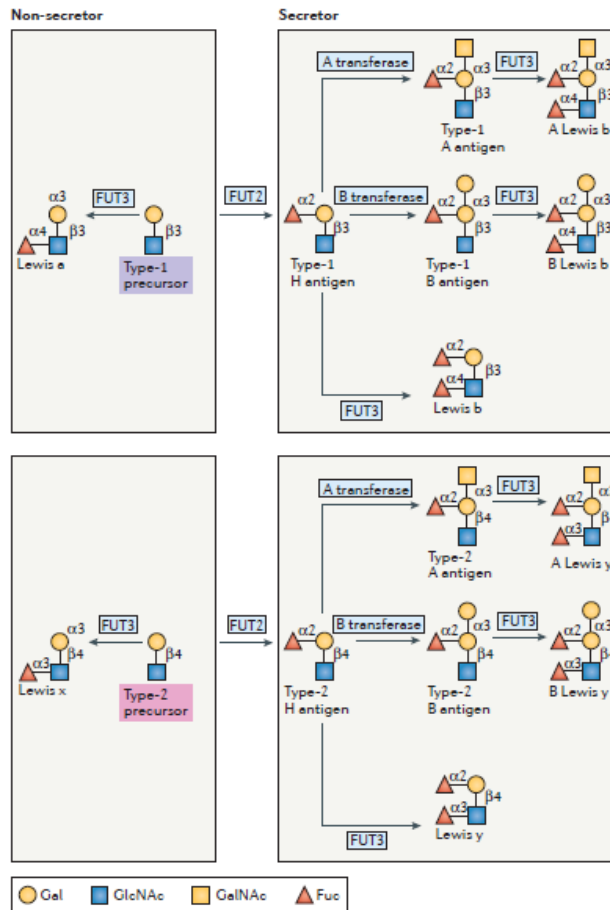
els veritables receptors (101, 102), representant el primer pas que precedeix a l'entrada del virus a la cèl·lula hoste.

Els HBGA representen un grup divers i altament polimòrfic de glicans units a lípids i proteïnes de membrana. Estan presents tant a la superfície d'eritròcits i cèl·lules epitelials de les mucoses respiratòria, digestiva i genitourinària; i en secrecions com la saliva, la llet materna i els continguts intestinals, trobant-se també lliures en sang (103, 104).

Principalment podem agrupar els d'antígens que formen part de la família HBGA en les quatre categories següents. La síntesi de cadascun d'ells està controlada per diverses famílies que comprenen els gens de l'estat secretor, del grup ABO i de Lewis (Le) (**Figura 8**) (105, 106):

- Estat secretor. El gen *FUT2* té un paper central en la determinació de l'estat secretor de l'individu. Codifica per una  $\alpha(1,2)$ fucosiltransferasa que catalitza la unió de grups fucosa als precursors de tipus 1 i 2, convertint-los en antígens H de tipus 1 o 2. Els individus que tenen una o dues còpies del gen *FUT2* funcionals són caracteritzats com a secretors (Se).
- Estat no secretor. S'han identificat diverses mutacions a la regió codificant del gen *FUT2* que en provoquen la seva nul·litat, individus que són caracteritzats com a no secretors (Se-). Sense aquesta activitat enzimàtica l'expressió dels antígens anteriors no es produeix, però si l'individu disposa d'activitat funcional en el gen *FUT3*, que codifica per una  $\alpha(1,4)$ fucosiltransferasa, s'afegeix un altre residu de fucosa que possibilita la síntesi d'antígens de Le a ( $Le^a$ ) i Le x ( $Le^x$ ) a partir dels precursors de tipus 1 i 2 (104, 107).

- Grup ABO. Successives reaccions dutes a terme per les transferases A i B codificades pels al·lels A o B del grup de gens del sistema sanguini ABO, afegeixen respectivament un residu de N-acetilgalactosamina o una galactosa als antígens H, formant antígens A o B de tipus 1 i 2.



**Figura 8.** Síntesi dels antígens HBGa. Els precursors de tipus 1 i 2 són modificats per l'acció del *FUT2* per generar els antígens H, que alhora poden ser modificats per les transferases A i B dels gens del grup sanguini ABO donant lloc als antígens A i B. Consecutivament, els antígens de Le<sup>b</sup> i Le<sup>y</sup> es produeixen quan els precursors anteriors es modifiquen per acció de *FUT3*. Els individus no secretors no disposen del *FUT2* funcional i no secreten antígens A, B ni H, però a través del *FUT3* els precursors poden esdevenir en antígens de Le<sup>a</sup> i Le<sup>x</sup>. Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, Nacetilgalactosamina; GlcNAc, Nacetilglucosamina. Imatge extreta de (17).

Tot i que els antígens A, B i H també determinin els precursors dels grups sanguinis A, B i O respectivament, el sistema de grup sanguini ABO és independent de l'estat secretor. Existeix una altra  $\alpha(1,2)$ fucosiltransferasa present només en cèl·lules progenitores hematopoètiques conegut com a *FUT1*, que sintetitza aquests HBGA a la superfície dels eritròcits enloc del *FUT2* (108).

- Antígens de Lewis. L'acció del gen *FUT3* afegeix un altre residu de fucosa als antígens A o B de tipus 1 i 2 esdevenint antígens de Le<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) i Le<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>): antígen A Le<sup>b</sup>, antígen B Le<sup>b</sup>, antígen A Le<sup>y</sup> i antígen B Le<sup>y</sup>. Per acció del gen *FUT3* també es sintetitzen antígens Le<sup>b</sup> i Le<sup>y</sup> a partir dels precursors de tipus 1 i 2 en individus no secretors.

Estudis fets mitjançant partícules pseudovíriques o Virus-Like Particles (VLPs) (estructures víriques que imiten la forma de la partícula però sense material genètic i capacitat d'infecció) corroboren que diversos genotips de HuNoV tant del GI com GII s'unirien a diversos tipus d'antígens HBGA, però que cap d'ells ho podria fer en el precursor directament sense el residu de fucosa unit (108).

La proporció d'individus que presenta un fenotip secretor o no secretor varia entre grups ètnics. Aproximadament el 75-80% de la població caucàsica, asiàtica i de diverses parts d'Àfrica són secretors, mentre que en poblacions americanes poden arribar fins al 95% com a fenotip predominant (109-111).

A la regió codificant del gen *FUT2* existeixen diverses mutacions nonsense i missense que són també específiques entre poblacions. Dues de les més freqüents són la Se<sup>428</sup> que resulta en un fenotip no secretor i la Se<sup>385</sup> en un fenotip secretor més dèbil (**Taula 1**). D'aquesta manera

es determina que l'estat secretor no seria de tipus binari estrictament, tot i que en la població caucàsica la mutació més freqüent present en un 95% és la Se<sup>428</sup> (112, 113).

**Taula 1.** Principals polimorfismes de *FUT2* amb efectes coneguts sobre l'estat secretor en diverses poblacions. Els dos tipus més comuns i més estudiats per la susceptibilitat a HuNoV apareixen marcats en negreta. Imatge extreta de (112).

Allele	Mutation Type	Phenotype	Population
Se <sup>302</sup>	Missense	Non-secretor <sup>a</sup>	Thai, Bangladeshi
Se <sup>385</sup>	Missense	Weak-secretor	East Asian
Se <sup>428</sup>	Nonsense	Non-secretor	Caucasian, African, Meso-American, Central Asian
Se <sup>571</sup>	Nonsense	Non-secretor	Filipino and Samoan
Se <sup>628</sup>	Nonsense	Non-secretor	Japanese and Chinese
Se <sup>658</sup>	Nonsense	Non-secretor	Chinese
Se <sup>357,480,778</sup>	Frameshift	Non-secretor	African
Se <sup>849</sup>	Nonsense	Non-secretor	Chinese and Filipino
Se <sup>del1</sup>	Deletion	Non-secretor	Indian and Bangladeshi
Se <sup>del2</sup>	Deletion	Non-secretor	Samoan
Se <sup>fus</sup>	Fusion	Weak-secretor	Japanese

La capacitat d'un individu d'expressar antígens del grup HBGA contribueix al risc de desenvolupar infeccions simptomàtiques per HuNoV (114, 115).

Els llocs d'unió de HuNoV a HBGA es troben localitzats específicament al domini P2 on se n'hi concentra una gran variabilitat. Cada genogrup o genotip de HuNoV n'exhibeix de propis que s'uneixen particularment a grups concrets d'HBGA (105, 116, 117), presentant-se la interacció com antigen-genotip específica.

Estudis de susceptibilitat demostren que alguns individus serien pràcticament resistent a les infeccions per HuNoV, ja que si no s'expressen a l'intestí cap dels tipus d'HBGA que reconeixen els genotips predominants romandrien protegits per aquests davant la infecció (95, 101, 118). Així, els individus no secretors caracteritzats per no expressar els antígens H, A o B i els antígens de Le<sup>b</sup> i Le<sup>y</sup> serien menys susceptibles o bé resistent a les infeccions per la majoria de genotips de HuNoV.

És el cas del genotip GI.1 o altrament conegut com a VN on s'ha demostrat mitjançant estudis en VLP que s'uneix als antígens H i A en cèl·lules epitelials de la mucosa gastroduodenal i que posteriorment s'internalitza (119). Harrington *et al.* també mostra la interacció d'aquest genotip amb els antígens de Le<sup>b</sup> i Le<sup>y</sup> sintetitzat per l'acció del gen *FUT3* (120). Així, els individus amb un fenotip no secretor, i que per tant no expressarien cap dels lligands anteriors, romandrien protegits davant les infeccions per aquest genotip, indicant la necessària presència del lligand per desencadenar la infecció (96). Per altra banda, altres genotips de GI com GI.2, GI.3, GI.4 i GI.7 poden interaccionar igualment amb els antígens H, A i antígens de Le<sup>b</sup> i Le<sup>y</sup> d'individus secretors i també amb els antígens de Le<sup>a</sup> i Le<sup>x</sup> sintetitzats per individus no secretors (108, 118, 121, 122).

Contràriament, el GII no té un patró d'unió a HBGA tan homogeni i presenta més variabilitat (123). Les diverses variants del genotip de la càpsida GII.4 exhibeixen una gran preferència per individus de tipus secretor (124), mostrant un ampli patró d'unió a multitud d'antígens com H, A i B i Le<sup>b</sup>, Le<sup>y</sup> duts a terme mitjançant VLPs (106, 116). Els individus no secretors restarien doncs pràcticament resistents, tot i que alguns estudis han demostrat la unió, encara que més làbil, a antígens de Le<sup>a</sup> i Le<sup>x</sup> (108, 116, 125, 126), confirmant-se la infecció d'aquest genotip també per individus no secretors. Un patró similar el mostren els genotips de la càpsida GII.6 (125) i GII.17 (127), essent predominantment específics per individus secretors.

El genotip GII.2 o virus Snow Mountain no presentaria una associació tan clara amb l'estat secretor podent infectar també a no secretors (128), tot i que mitjançant VLPs mostri només una interacció amb antígens de tipus A i B (116). Aquesta pèrdua de susceptibilitat podria

indicar l'existència d'altres lligands primaris pels quals aquest genotip seria capaç de causar infeccions als hostes (116). Per altra banda, el genotip GII.3 tampoc mostraria una associació només per l'estat secretor, tot i que en alguns estudis els individus no secretors han semblat ser-hi menys susceptibles de causar infecció (129–131), tenint un patró d'unió als antigens A, B i Le<sup>b</sup> (116).

Com es menciona anteriorment, la distribució dels diversos fenotips de l'estat secretor depèn del grup ètnic. Així, les poblacions amb més percentatge de secretors com la Mesoamericana, del voltant del 95% (110), s'associen a una presència major i a un risc més elevat per aquells genotips de la càpsida més dependents de l'estat secretor com per exemple GII.4. Tanmateix, les poblacions que mostrin més diversitat i polimorfismes d'HBGA també presentaran una diversitat més gran en genotips de HuNoV (128). Pel que afecta al fenotip de Le, en les poblacions europees o asiàtiques és molt poc freqüent (6-11%) que aquest estigui inactiu, a diferència de l'africana (25%) (132, 133).

A part de HuNoV, la presència dels diversos HBGA també està relacionada amb diferències de susceptibilitat a d'altres infeccions víriques, com per exemple *Rotavirus* (RV), *Rhinovirus*, *Echovirus*, *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Orthopneumovirus*, així com bacterianes: *H. influenzae*, *N. meningitis*, *S. pneumoniae* i a infeccions urinàries causades per *E. coli* (111). També apareix descrita la unió de SARS-CoV-2 a aquest tipus de glicans (134, 135).

## 1.6.2. Lligands d'unió diferents d'HBGA

Fins al moment, només la unió a HBGA ha demostrat tenir un paper en la infecció per HuNoV (96, 136), però a la literatura també s'han descrit

altres lligands d'unió o molècules presents a la superfície cel·lular que obren la porta a poder constituir una altra via d'interacció amb l'hoste alternativa als HBGA:

- Compostos simples
  - L'heparan sulfat consisteix en una llarga cadena carbohidratada formada per la repetició de disacàrids presents en una àmplia varietat de teixits, que apareix com un proteoglicà quan dues o més cadenes es troben juntament amb proteïnes de la superfície o matriu cel·lular (137). Entre d'altres funcions com la regulació del creixement o l'adhesió cel·lular hi són també la d'actuar com a receptor per altres virus, i també bacteris i paràsits (138). Estudis realitzats amb VLPs han demostrat que l'heparan sulfat s'associa eficientment amb HuNoV GII, però no amb GI (139).
  - L'àcid siàlic és un terme genèric que agrupa els derivats de l'àcid neuramínic, un sucre d'onze àtoms de carboni que resulta un lligand comú per a membres de la família *Caliciviridae* (140), i també per un ampli espectre de virus com Enterovirus (EV) o RV (141). Alguns estudis han demostrat la capacitat d'unió de genotips de HuNoV GI i GII a l'àcid siàlic present en esfingolípids (gangliòsids) (142) i a glicans siliats o fucosilats (143).
- Compostos complexos
  - La llet materna té una composició molt rica en oligosacàrids en forma de glicolípids i glicoproteïnes, apareixent també com un compost involucrat en el reconeixement de HuNoV (144, 145). Diversos neoglicoconjugats de la llet actuarien com a esquer, unint-se a diverses soques de HuNoV promovent-ne el seu segrest, i interrompent així la unió a HBGA a l'hoste (146, 147).

- Cèl·lules procariotes que presenten a les seves parets residus semblants als antígens de tipus H (148), de manera que la unió de HuNoV GI i GII s'hauria demostrat almenys en deu espècies de bacteris entèrics humans (149) i fermentadors de l'àcid làctic (150).
- Lligands alimentaris
  - En alguns vegetals, com per exemples les fulles d'enciam, s'han demostrat capaces d'unir-se a HuNoV (151) a través de diversos residus de carbohidrats presents a les seves parets, i que una vegada tallades o madures, n'incrementen la seva capacitat d'unió (152).
  - Les ostres representen un tipus d'animals invertebrats que s'alimenten a través de la filtració d'aigua, i capaces de concentrar partícules víriques a través d'aigua si es troba contaminada. El mecanisme que explicaria la seva facilitat de bioacumulació tant de HuNoV GI com GII seria una vegada més la presència de polisacàrids semblants als HBGA en les cèl·lules del seu aparell gastrointestinal (153, 154).

## 1.7. Epidemiologia

HuNoV apareix posicionat com un patogen de rellevància pels humans degut a les característiques intrínseques i extrínseques següents.

Les partícules víriques de HuNoV s'excreten en quantitats elevades a través de la femta ( $10^5$ - $10^{11}$  partícules víriques/gram) tant en individus simptomàtics com asimptomàtics, i en el vòmit, on un episodi ( $<1 \cdot 10^7$  partícules víriques/gram) pot contaminar potencialment l'ambient (15, 155, 156). L'excreció del virus comprèn un període extens, iniciant-se



entre les 3-14h abans de l'inici de símptomes i finalitzant-se al cap de tres setmanes després de la infecció (en persones grans, immunocompromeses i nounats pot ser més llarga, i fins i tot arribar a cronificar-se) (6, 157). Aquesta excreció una vegada els símptomes han finalitzat augmenta el risc potencial de disseminació secundària, presentant taxes d'atac secundari observades del 30% o més entre contactes propers (158, 159).

Tanmateix, HuNoV té l'habilitat per poder-se transmetre fàcilment entre individus a partir d'una dosi baixa d'infecció estimada en 18-1000 partícules víriques, una immunitat protectora relativament curta i una elevada estabilitat ambiental (160, 161). Les partícules víriques resulten resistents a temperatures  $\leq 63^{\circ}\text{C}$ , en un ampli rang de pH àcids  $\geq 3$  i també alcalins pH  $> 8$ , en solucions de  $\leq 6\text{mg/mL}$  de clor lliure, a l'etanol, entre d'altres compostos (162). Es calcula que amb una esperança de vida de 80 anys, una persona experimentarà entre 3 i 8 episodis de GEA per HuNoV al llarg de la seva vida (163, 164).

### **1.7.1. Vies de transmissió**

Durant episodis de diarrea i vòmit existeix una gran transmissió de partícules infeccioses de HuNoV, que a través de la ruta fecal-oral, es transmetran a nous hostes. La principal via de transmissió directa és la que es coneix com a persona-persona, a través del contacte mà-boca amb un individu infectat (165). No menys rellevants, existeixen també les vies indirectes incloent la transmissió a través d'aliments i aigües contaminants, de fomites, o per via aèria a causa dels aerosols emesos durant el vòmit (1, 166, 167).

Estudis epidemiològics mostren que cada genogrup i genotip de HuNoV podria presentar característiques individuals pròpies (17). Així, el GI presenta una major estabilitat en aigua que no pas GI, i per tant, apareix més fàcilment relacionat en aquest tipus de transmissió. Per contra, el GI té una capacitat de transmissió més elevada entre persona-persona (p/p) o també a través de fomites (107).

### **1.7.1.1. Higiene personal**

La importància de la higiene de mans en la reducció d'agents infecciosos és ben coneguda, tot i que en resulti difícil quantificar-ne els efectes sobre la transmissió de malalties (168).

Durant l'existència de brots de HuNoV, Park *et al.* van reportar un percentatge de positivitat en les mans d'un 73.3% dels residents en centres d'atenció prolongada, i d'un 20% en cas de treballadors. Les càrregues virals eren més altes en les mans d'aquells individus simptomàtics ( $10^2$ - $10^7$  cg), seguit dels treballadors post-simptomàtics ( $10^2$ - $10^4$  cg) o també residents post-simptomàtics ( $10^4$ - $10^5$  cg) (169).

Les persones que participen en qualsevol dels punts de la cadena alimentària (agricultors, recol·lectors, empaquetadors, manipuladors) fins que arriba al consumidor són reconeguts com una de les fonts més comunes de contaminació alimentària (170, 171). N'hi hauria múltiples exemples, com l'estudi de Thornley *et al.* que descriuen la relació entre 5 brots de HuNoV vinculats a la falta d'higiene d'un únic manipulador tot i trobar-se en un període post-simptomàtic (172). A més de poder-se relacionar amb el possible origen, en escenaris de brots, els manipuladors d'aliments i els treballadors sovint també adquireixen la infecció. Així, Sabrià *et al.* mostren que un 59.1% dels manipuladors

d'aliments en restaurants o càterings i d'institucions com residències o escoles on es van produir brots de GEA van ser positius per HuNoV (173).

És a través de l'existència d'una mala praxis i/o una falta d'higiene quan es poden inocular i transmetre molt fàcilment partícules víriques de HuNoV, per contacte directe en un ampli ventall de superfícies.

### 1.7.1.2. Transmissió alimentària

Conjuntament amb *Campylobacter* spp., els HuNoV representen una de les primeres causes de malaltia transmesa a través d'aliments i la quarta en mortalitat segons WHO (World Health Organization) (174). L'últim informe de l'EFSA (European Food Safety Authority) referent als brots d'origen alimentari de l'any 2019, situa a HuNoV com l'agent causant del 14.74% (n=457) del total de brots amb origen conegut, per darrere de *Salmonella* spp. i el grup que engloba toxines d'origen bacterià; augmentant un 13.1% respecte l'any anterior. Aquesta xifra creix fins un 30.93% (n=11,125) de casos de malaltia ocasionada per HuNoV sobre el total causat pels diversos agents infecciosos, i essent-ne també el responsable del 8.48% (n=275) del total d'ingressos. Per cada brot de HuNoV d'origen alimentari conegut es genera una mitjana de 24.3 casos (175).

Malgrat això, no tots els aliments presenten el mateix risc, ja que cadascun té unes característiques pròpies, així com el tipus de cultiu, que els fan més susceptibles a un determinat tipus de patògens. Els que es consumeixen crus o bé tenen un procés més alt de manipulació (incloent després de ser cuinats) tenen un risc més elevat de contaminació per HuNoV (176, 177). Cal presentar una atenció especial

al marisc, i en particular als mol·luscs bivalves, com per exemple ostres, musclos i cloïsses, pel seu potencial bio-acumulador de HuNoV ja que són espècies que s'alimenten a través de la filtració d'aigua (178, 179). Guix *et al.* mostren un revisió de 22 estudis de prevalença de HuNoV a nivell europeu en mol·luscs bivalves amb un rang de positivitat d'entre 4.2-88.1%, essent en 14 d'ells superior al 30% (180). També s'ha calculat que la persistència de HuNoV en marisc pot ser de setmanes, o fins i tot mesos (181)

L'aigua representa doncs un altre vehicle de contaminació per HuNoV que sol precedir a la contaminació alimentària. Una absència en el seu tractament perquè pugui ser apta pel regadiu, per ús recreacional o pel propi consum, o bé per la ineficiència d'un sistema de depuració d'aigües residuals adequat, pot resultar en un origen de contaminació important (182).

Per altra banda, els fruits vermells com per exemple les maduixes, mores, gerds, groselles o bé anacards, o vegetals com fulles d'enciam o d'altres hortalisses, també constitueixen matrius alimentàries implicades com a vehicle que facilita la transmissió de HuNoV. Un dels motius rau en el tipus de cultiu, ja que creixen molt a prop del terra i estan més exposades a la contaminació a través d'aigua, sobretot en èpoques de fortes pluges i durant inundacions, coincidint quan les plantes de tractament d'aigües residuals es veuen sobrecarregades. Altres motius són una elevada manipulació durant la collita, la forma replegada de l'aliment, la dificultat per a rentar-los degut a la seva fragilitat en alguns casos i per la seva manera de consum també crua (**Figura 9**) (183, 184).

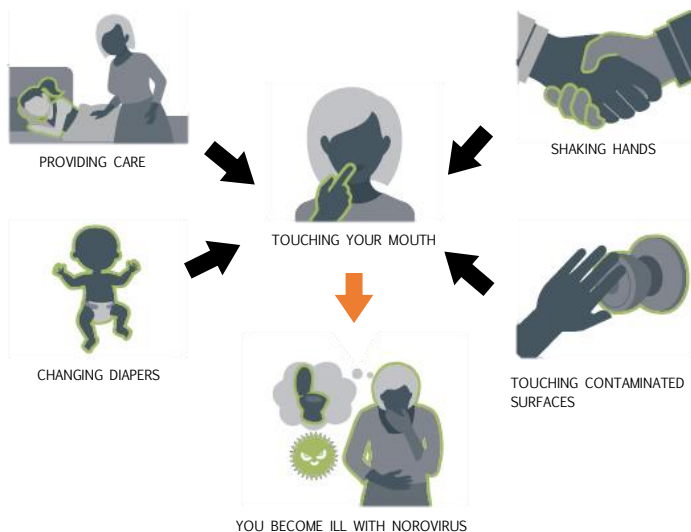
Estudis recents sobre la prevalença de HuNoV duts a terme en diverses mostres d'hortalisses (fulles d'enciam, ruca, espinacs, pastanagues) i en fruites toves o fruites del bosc mostren una prevalença de HuNoV d'entre



també pels costos associats a les mesures adoptades per reduir-ne els impactes sobre la població (194).

### 1.7.1.3. Contaminació ambiental

Les partícules víriques són fàcilment transferides entre les mans i les superfícies, facilitant un cicle de transmissió també ambiental (195). Una multitud de fomites com podrien ser interruptors, telèfons, aixetes, panys, estris de cuina, comandaments, etc poden ser fàcilment contaminats durant brots de HuNoV a través del contacte dels individus afectats, o bé també de manera directe a través de la femta i vòmit (**Figura 10**) (196). L'efecte de l'elevada estabilitat d'aquest virus en superfícies i la seva transmissió per causar noves infeccions a través de la contaminació de superfícies és evidenciada per Cheesbrough *et al.* on s'argumenta el contagi de 2 operaris de neteja aliens a la institució 12 dies després de la finalització d'un brot de HuNoV (197).



**Figura 10.** Transmissió de HuNoV p/p i a través de superfícies. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Imatge extreta de [www.cdc.gov/norovirus](http://www.cdc.gov/norovirus).

Tanmateix, Rico *et al.* mostren que en un 67.4% de les superfícies dels 41 brots de HuNoV estudiats en institucions tancades i semi-tancades (residències, centres sociosanitaris, escoles, guardaries, hospitals, etc) eren positives tot i haver-se efectuat les recomanacions d'higiene, essent les zones del bany i els ascensors les contaminades amb més freqüència (198). Així, una exposició inconscient per part d'altres convivents en pot continuar facilitant l'expansió i propagació.

Boxman *et al.* descriuen la presència de HuNoV durant l'absència de brots en un 3.4% de les superfícies analitzades en cuines de residències, entre un 0.9-7% en cuines d'hospitals i en 1.6% en cuines de càterings durant l'època de l'any en que es registren més casos (199). Aquesta contaminació de superfícies permet actuar com un possible reservori de la infecció, on la seva eliminació formaria part del control (200).

### **1.7.1.4. Transmissió no fecal-oral**

La ruta fecal-oral resulta la via de transmissió principal per la infecció de HuNoV. Tanmateix, existeixen evidències que suggereixen que també es pot transmetre a través de l'aire (201). Durant episodis de vòmit o en descàrregues d'aigua en el lavabo, les partícules infeccioses es re-suspenen en forma d'aerosol a l'aire, de manera que poden dipositar-se al tracte respiratori superior a través de la inhalació i posteriorment empassar-se (201, 202). Bonifait *et al.* mostren la detecció de partícules víriques a l'aire en 6 dels 8 brots de HuNoV estudiats, estimant-ne una concentració suficient com per ser la causa de noves infeccions (203). Nenonen *et al.* n'és un altre exemple on també s'hi descriu l'evidència de HuNoV en l'aire en brots nosocomials en casos que experimenten vòmits (204). Existeix una associació entre la presència de partícules en l'aire durant episodis de vòmit que no es manifesta en episodis de

diarrea, però tanmateix no hi hauria una evidència directa de contraure la malaltia a través de la transmissió de partícules per l'aire. Tot i això, la disseminació a través d'aerosols podria resultar un factor important en el desencadenament de brots (201).

### **1.7.2. Brots epidèmics**

Els HuNoV són la causa principal dels brots de GEA a tot el món, essent-ne l'agent causant en més del 50%, i representant fins al 90% dels casos de GEA no bacterianes (205). Existeix una gran diversitat d'ambients i centres en els quals es poden produir amb més facilitat l'aparició de brots per HuNoV, com serien les comunitats tancades o semi-tancades que inclouen hospitals, residències, centres socio-sanitaris, escoles, llars d'infants, hotels i també entorns recreacionals (creuers, campaments, albergs, etc). Tots ells es caracteritzen per contenir un nombre divers de persones que mantenen una convivència estreta, que conjuntament amb les característiques pròpies del virus en facilita una ràpida aparició en forma de brots. A Catalunya, l'últim estudi d'incidència de brots de GEA comprès en el període entre gener 2010 - desembre 2012 reporta 169 brots produïts en diverses institucions, dels quals en 128 d'ells es va identificar HuNoV com l'agent causant afectant a un total de 3,239 individus (5). Diversos estudis també situen les residències com el tipus d'institucions més afectades per brots de gastroenteritis per HuNoV (206, 207).

### **1.7.3. Casos esporàdics**

Cal esmentar que els brots declarats de HuNoV representen una petita part del total de casos, ja que només aquells que consulten els serveis



sanitaris i dels quals es pogut fer un diagnòstic i estudi epidemiològic es notifiquen als serveis de salut pública i són investigats. Seguint aquesta línia, la incidència general que té entre la població és difícil d'establir comptant amb un nombre escàs de diagnòstics deguts a diverses limitacions. En primer lloc, la mostra tradicional pel diagnòstic de HuNoV en pacients amb GEA són les deposicions de femta (208), que resulten infreqüentment preses durant les visites als centres de salut. Per altra banda, la naturalesa lleu de la malaltia ocasionada i no haver de requerir d'hospitalització, a excepció almenys dels individus considerats de més risc, provoca que la majoria de símptomes ja hagin cessat abans que en pugui ser confirmat el seu diagnòstic. Per tant, el nombre d'infeccions es trobaria infrarepresentat (209).

### **1.7.4. Infeccions asimptomàtiques**

HuNoV també és detectat en individus que no presenten cap tipus de símptoma. Estudis de prevalença mostren valors d'entre el 7-12% (210, 211) d'infeccions asimptomàtiques, prestant especial atenció a la població infantil <5 anys (6). La presència de símptomes deguda a la infecció per HuNoV és en part dependent del genotip, ja que alguns estudis demostren que el genotip GII.4 causa predominantment infeccions simptomàtiques, i és relativament menys freqüent en individus asimptomàtics en comparació amb altres genotips (212-214). La no presència de símptomes també és correlaciona amb una determinada expressió de factors de susceptibilitat HBGA (96, 215). Per altra banda, encara és desconegut el paper que hi juga el sistema immunitari en el desencadenament de respostes diferents entre diversos hostes (157, 216).

Pel que fa als nivells d'excreció viral, en adults sans s'ha demostrat que les persones amb GEA presenten concentracions de virus en femta aproximadament 10 vegades més altes que aquelles que no presenten símptomes (158, 159). Malgrat això, altres estudis durant la presència de brots no han reportat diferències estadísticament significatives (173, 217).

Tanmateix, els individus asimptomàtics tenen també un paper important en la transmissió de la infecció podent actuar com un reservori, on aquest coneixement hauria de tenir un impacte en el desenvolupament d'estratègies de prevenció.

## **1.8. Detecció de HuNoV a la saliva**

En un estudi realitzat per Kirby *et al.* amb mostres de pacients afectats en dos brots (un familiar i un altre en un centre hospitalari), l'RNA de HuNoV també es va detectar a part de a la femta, en mostres obtingudes de rentat bucal dels individus infectats, alguns dels quals sense que haguessin presentat vòmits. En el brot familiar, es va anar detectant regularment la presència de HuNoV a la saliva fins als 10-15 dies després de l'inici del símptomes en tots els 6 membres estudiats. Pel que fa al brot hospitalari, dels 59 pacients amb GEA almenys un 24% va ser positiu per HuNoV a la saliva (218).

La presència de HuNoV a la cavitat oral podria constituir un nou enfocament diagnòstic a estudiar per a l'obtenció de mostres clíniques i la detecció de la infecció. Aquest mètode resultaria més atractiu i alternatiu per a la seva detecció, fent-lo més fàcil, ràpid i menys invasiu, podent-se implementar tant a casa, com als centres de salut, o de recollida pròpia per part dels cuidadors i pacients. Evitaria el procés

difícil que suposa una recollida tant de femta com de vòmit, així com l'elevat risc de contagi per exposició.

Zhuo *et al.* també detecten HuNoV i d'altres virus entèrics humans com per exemple Adenovirus (AdV), RV, SaV i Astrovirus (AstV), en mostres de la cavitat oral de pacients amb símptomes de GEA. Els resultats van indicar que en un 16.9% dels individus afectats es va poder aïllar l'RNA d'algun d'aquests virus a la cavitat oral (219).

Per altra banda, s'ha detectat també la presència de HuNoV a la saliva en un pacient immunosuprimit i dependent d'edat avançada, el qual patia una diarrea persistent després de més de 18 mesos causada per HuNoV. El motiu més interessant és que aquesta presència no es podia correlacionar tampoc amb el vòmit o d'altres activitats descrites com un risc per a la infecció (canvi de bolquers, neteja de la sala, deposicions al lavabo) perquè el pacient resultava pràcticament immòbil. També s'hi va descriure la transmissió de HuNoV per l'aire al detectar-se en diversos punts de la sala d'hospital que ocupava, tot i que els aspirats nasofaríngecs o broncoalveolars fossin negatius. Es creu que el fet responsable de la dispersió a través de l'aire poden ser les partícules de HuNoV de la cavitat oral i/o saliva, proposant-se com un nou tipus de transmissió i risc per a les infeccions per HuNoV (220).

En d'altres articles també apareix descrita la presència de HuNoV en mostres nasofaríngecs, possiblement pel reflux produït del tracte gastrointestinal (221). Kweon *et al.* mostren la detecció de HuNoV en un 14.7% de mostres nasofaríngecs d'individus positius i simptomàtics en femta (222) i Dábila *et al.* en un 11.4% (223).

Tot i que el reflux dels continguts gastrointestinals pugui relacionar-se amb la contaminació de la cavitat oral, el mecanisme que hi hauria darrere continua sense ser clarificat. Altres factors intrínsecs del virus

com el genotip o propis de l'hoste en podrien explicar aquest comportament particular.

## **1.9. Diagnòstic**

### **1.9.1. Diagnòstic molecular**

La majoria d'estudis per a la detecció de HuNoV es basen en l'anàlisi de l'RNA mitjançant tècniques de diagnòstic molecular. La detecció de HuNoV està majoritàriament basada en la detecció del genoma del virus a través de tècniques de retrotranscripció i PCR (RT-PCR), o bé la RT-PCR quantitativa o en temps real (RTqPCR). De les dues mencionades, la RTqPCR és la tècnica de referència gràcies a la seva elevada sensibilitat, especificitat, rapidesa i capacitat per generar dades quantitatives (224).

La regió d'unió entre l'ORF1 i ORF2 és la més conservada del genoma de HuNoV amb un alt percentatge d'homologia entre els genotips dins de cada genogrup (225). Aquesta característica permet que sigui la regió ideal pel disseny de primers per la RTqPCR per tal d'aconseguir una elevada sensibilitat, així com una àmplia detecció dels diversos genotips.

Paral·lelament, mentre que el diagnòstic molecular té una enorme utilitat en el diagnòstic clínic, la interpretació dels resultats positius quan es vol conèixer el risc de transmissió de la infecció en mostres alimentàries o ambientals contaminades, comprèn algunes limitacions, ja que no permet la discriminació de la capacitat infecciosa que puguin tenir les partícules víriques detectades. D'aquesta manera, tant els virions que puguin tenir la càpsida danyada com els que conservin en perfecte estat la seva capacitat d'infecció són tractats com un únic conjunt,

sobreestimant així la quantitat de partícules víriques amb capacitat d'infecció (226).

### **1.9.2. Mètodes estandarditzats d'anàlisi d'aigües i aliments**

La norma ISO (International Organization for Standardization) número 15216 descriu un procediment estandarditzat per a la detecció de virus de l'hepatitis A (HAV) i HuNoV GI i GII, essent la única existent per a l'anàlisi de patògens vírics en aliments i aigües de consum. Tant HuNoV com HAV tenen en comú ser dos del virus entèrics més rellevants responsables de la majoria de brots de naturalesa vírica transmesos per aliments i aigües, alhora que també comparteixen tant vehicles com modes de transmissió (227–229).

La descripció del seu procediment d'anàlisi es troba dividit en dos mètodes diferents:

- Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification (ISO 15216-1:2017) (230).
- Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection (ISO 15216-2:2019) (231).

L'objecte d'aquesta regulació ISO 15216 comprèn l'anàlisi d'ambdós patògens en mostres procedents de productes alimentaris tals com fruites toves, productes vegetals, aigua embotellada, mol·luscs bivalves i superfícies alimentàries mitjançant l'ús de la RTqPCR, i no havent-se validat per altres tipus de mostres diferents a les anomenades (232). En qualsevol de les parts apareix detallat com s'ha de procedir per a la correcta obtenció de les mostres, els reactius necessaris, i els principis

de concentració, extracció, i anàlisi dels genomes d'RNA mitjançant tècniques moleculars, i la consegüent interpretació dels resultats amb la presència de virus control per monitoritzar-ne el procés. La principal diferència entre elles és en el mètode d'anàlisi, la part 1 ens dona una aproximació quantitativa dels resultats, mentre que a la part 2 resulta en una anàlisi de tipus qualitatiu.

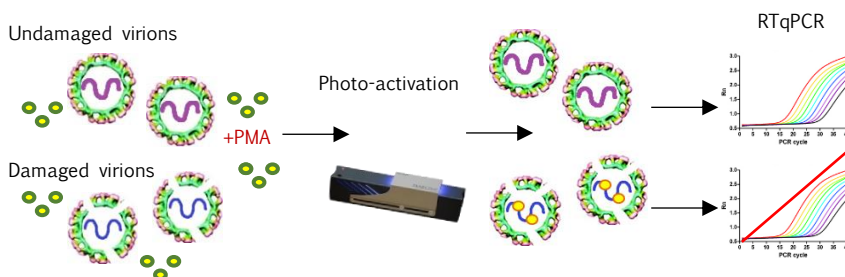
### **1.9.3. Correlació amb infectivitat**

L'ús del model de cultiu cel·lular de HuNoV en enteroids del jejú humà (233), el cultiu en cèl·lules B (234), o d'altres mètodes de cultiu alternatius haurien de permetre en un futur poder dur a terme estudis de supervivència que confirmessin la viabilitat o no dels genomes de HuNoV analitzats per la RTqPCR (235). Malauradament, els sistemes disponibles actuals de propagació de HuNoV al laboratori són extremadament costosos i encara poc universals, podent-se aplicar únicament a determinats genotips i en laboratoris altament especialitzats.

Actualment, una de les opcions que hi hauria per permetre aquesta diferenciació entre virus infecciosos i no infecciosos és un pretractament del virus amb agents intercalants de l'àcid nucleic fotoactivables, com per exemple la monoazida de propidi (propidium monoazide, PMA) (236). Aquests compostos, també permeten determinar la viabilitat de les cèl·lules mitjançant tècniques moleculars (237, 238). Teòricament, aquests compostos només penetren en cèl·lules que tenen compromesa la integritat de la seva membrana o càpsida, fet que facilita la seva aplicació sobre diversos tipus de patògens, inclosos els HuNoV, per a discernir entre cèl·lules/virions viables o no viables com a alternativa als mètodes de cultiu (239). Un cop a l'interior del virió, el PMA actuaria

intercalant-se en àcids nucleics de doble cadena i quedant-s'hi covalentment unit després d'una exposició a llum visible. Aquesta interacció interfereix i evita l'amplificació en la PCR o RT-PCR d'aquells genomes de partícules víriques que tinguin la seva càpsida compromesa (**Figura 11**).

Lee *et al.* mostren que un tractament tèrmic a 90°C durant 1 minut en suspensions de norovirus murí (MuNoV) a concentracions de  $5.21 \pm 0.12 \text{ Log}_{10}$  PFU/mL permetia anular totalment la capacitat de replicació en cultiu cel·lular, però que mitjançant l'anàlisi comparatiu per la RTqPCR, les reduccions en cg fossin molt menors ( $0.76 \text{ Log}_{10}$ ). En canvi, fent ús d'un tractament amb PMA abans de l'anàlisi per la RTqPCR les reduccions observades van ser molt superiors ( $3.76 \text{ Log}_{10}$ ), aproximant-se més als resultats obtinguts en cultiu cel·lular. Tanmateix, el tractament amb PMA no inhibeix completament l'amplificació per RTqPCR dels genomes de virus inactivats, però permet aconseguir una millor detecció i quantificació de les partícules que podrien causar una infecció (240). En d'altres matrius, Randazzo *et al.* també van aconseguir una reducció en la senyal d'amplificació per la RTqPCR en enciams inoculats amb suspensions de  $3.6 \text{ log}_{10}$  de HuNoV GII inactivats tèrmicament. Sense un tractament amb PMA van observar reduccions de cg de  $0.58 \text{ Log}_{10}$ , i mitjançant l'ús de PMA de  $2.59 \text{ Log}_{10}$  (241, 242).



**Figura 11.** Mecanisme mitjançant foto-activació que permet dur a terme una discriminació entre la viabilitat dels genomes a través de l'acció del PMA intercalant-se a les partícules que tenen compromesa la seva integritat. Elaboració pròpia.

Per altra banda, d'altres metodologies que també poden permetre la diferenciació entre partícules infeccioses i inactivades seria un pretractament amb nucleases o enzims proteolítics abans de l'extracció dels àcids nucleics, per tal d'eliminar qualsevol senyal per genomes exposats sense càpsida, o feta malbé (243). Paral·lelament, l'ús de glicans com les mucines gàstriques de porc també permet segrestar i recuperar de forma específica les partícules que no tinguin les càpsides danyades i potencialment infeccioses (244).

Els virus són partícules inertes quan es troben fora dels seus hostes, de manera que el seu risc associat depèn de l'habilitat que tinguin per mantenir la infectivitat. Així, sense poder disposar d'un mètode robust de cultiu cel·lular per a avaluar la infectivitat de HuNoV tant en mostres alimentàries com d'aigües, aquest tipus de pre-tractaments abans de l'anàlisi per la RTqPCR poden constituir una nova eina en estudis d'avaluació de risc per contaminació de HuNoV. D'altres alternatives en són la utilització de virus model de HuNoV que es puguin propagar a través de cultiu cel·lular i que, ateses les seves característiques en puguin imitar el seu comportament. Per HuNoV, els virus model més emprats per estudis de supervivència i inactivació són el FCV, el MuNoV i el Virus de Tulane (TV). Entre ells, MuNoV podria ser el millor substitut a causa de l'etiologia de la malaltia que ocasiona, per ser més proper filogenèticament i en característiques bioquímiques i genètiques a HuNoV (245–247).

## **1.10. Prevenció i control**

La prevenció de HuNoV és difícil tenint en compte la seva elevada persistència i a la seva fàcil transmissibilitat. Conèixer i dur a terme



bones pràctiques pel seu control ens permetrà mitigar-ne la seva presència. A continuació, es descriuran algunes de les mesures a adoptar part de les indústries alimentàries, del públic general i consumidors i per part de les autoritats competents per la prevenció i control de HuNoV.

### **1.10.1. Mesures per part de les indústries alimentàries**

#### **1.10.1.1. Mol·luscs bivalves**

El mecanisme prèviament descrit de bio-acumulació per part dels mol·luscs bivalves demostra la dificultat existent en l'eliminació de HuNoV una vegada s'han criat en aigües contaminades.

Els virus entèrics com HuNoV hi poden arribar transportats a través de les aigües superficials (248). L'aigua potencialment contaminada com a producte de desús de l'activitat humana és tractada abans que pugui tornar a ser utilitzada. Aquest pas però, no és sempre suficient per assegurar una eliminació eficaç de HuNoV en l'aigua depurada que posteriorment torna a abocar-se al riu, mostrant una relació amb l'aparició de brots relacionats (249–252). Tanmateix, el marisc cultivat pot quedar subjecte a la contaminació de HuNoV durant episodis de pluges abundants, quan les plantes de tractament d'aigües residuals resulten en abocament incontrolats si es troben fora del seu abastament; o fins i tot, per descàrregues de vaixells als ports (253, 254).

El risc d'infecció per HuNoV es pot mitigar implementant tant mesures de control abans de la recol·lecció del marisc, i també, mitjançant tractaments tèrmics una vegada s'han recol·lectat. A la UE, la seguretat alimentària a les àrees de producció del marisc es basa en tres categories segons les concentracions d'*E. coli* (255), recomanant-ne una

depuració en aigua de mar d'aquells que l'excedeixin com a mesura correctora, tot i que resulti un tractament insuficient per reduir el risc en cas de contaminació per HuNoV (256, 257). Alhora, la presència o absència de bacteris indicadors resulten de poca confiança per evidenciar la presència de HuNoV o d'altres virus entèrics (258, 259).

Un tractament tèrmic al marisc assolint una temperatura de 90°C durant 1.5 minuts es considera eficaç per eliminar la infectivitat d'agents virals (260). Malgrat això, existeix un brot causat per HuNoV reportat en el RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) l'any 2018 a través de musclos congelats que havien passat per un tractament tèrmic (RASFF 2018.1014). Altres tècniques com la refrigeració, congelació, pasteurització o la marinació del marisc no resultarien efectives per reduir el risc d'infecció per HuNoV (261).

Abans de la recol·lecció de mol·luscs bivalves existeixen també aspectes importants a tenir en compte. Aquests inclouen assegurar un efecte de dilució i circulació de l'aigua utilitzada durant el cultiu, un control periòdic en l'aigua dels emplaçaments i evitar la proximitat a estacions de tractament d'aigües residuals (262).

### **1.10.1.2. Fruites i verdures**

Les fruites i verdures com per exemple maduixes, fruites del bosc o enciams i altres tipus de vegetals poden ser cultivats tant en camps oberts, o també ser recollits a la natura (boscors, prats, aiguamolls). Una recomanació cap a un mètode de cultiu hidropònic o sense sòl pot reduir la contaminació causada durant episodis de fortes precipitacions, ja que augmenta la transferència de HuNoV des d'aigües residuals cap

als cultius, sigui pel contacte directe al sòl o través d'inundacions (263, 264).

L'ús d'aigua contaminada per HuNoV en els sistemes d'irrigació de fruites i verdures, per diluir els químics agroalimentaris i fertilitzants, o per rentar-les, és un altre risc important per ser considerat (265). Aquells vegetals que han estat regats amb aigües d'origen fecal constitueixen un important perill pel desencadenament de brots, així, és recalcat l'ús de sistema de drenatge i rec si és possible només amb aigua potable o de qualitat microbiològica (264).

Un procés de rentat amb aigua és una pràctica comuna en aquest tipus d'aliments. Alguns estudis mostren una reducció de  $\log_{10}$  de HuNoV de fins a 1.5  $\log_{10}$ , tractament que podria ser insuficient si les quantitats de HuNoV resulten superiors (266–268). L'ús d'altres desinfectants com per exemple l'hipoclorit de sodi en concentracions 50-200 ppm resultaria eficaç per reduir la infectivitat de MuNoV entre 1.5-2.2  $\log_{10}$  (269, 270). Paral·lelament, en el model de cultiu cel·lular de HuNoV mitjançant enteroids humans, es constata una reducció total de la infectivitat de HuNoV si les concentracions de clor lliure són superiors a 50 ppm durant un temps d'un minut o superior (233).

Tanmateix, els productes resultants de l'ús de clor desencadenen en la creació de compostos com les cloramines o trihalometans (THM) essent poc respectuosos amb el medi ambient. Per tal de reduir-ne l'impacte existeixen alternatives com l'àcid peracètic (PAA), un potent agent antimicrobià d'ús creixent a la indústria, que provoca una toxicitat menor, i no veu compromesa la seva efectivitat a causa del pH o per la presència de matèria orgànica (271). Diversos estudis presenten assajos de desinfecció en aquest tipus de matrius alimentàries i superfícies, assolint nivells de reducció de la infectivitat d'entre 2 i 3  $\log_{10}$ , duts a

terme en MuNoV, FCV i TV en concentracions de PAA d'entre 10-100 ppm (272-276). Alternativament a aquests compostos, també existeixen altres tractaments com són l'ozó, l'ús d'aigua electrolitzada, radiació, HPP (High-Pressure Processing) o altres compostos naturals per reduir la presència i la infectivitat de HuNoV (224).

## **1.10.2. Mesures a mans del públic general i consumidors**

### **1.10.2.1. Higiene i desinfecció**

La pràctica de les tècniques d'higiene de mans en els moments apropiats és un dels elements més importants per la prevenció i el control de malalties infeccioses segons estableix WHO (277). Aquesta pràctica té una relació cost efectivitat molt elevada, ja que és el factor principal i cabdal per mitigar la transmissió de HuNoV, on una falta representa un important origen de contaminació. Liu *et al.* descriuen una mitjana de  $10^4$  partícules víriques en les mans de voluntaris infectats (278), on amb una de taxa de transferència aproximada del 10% entre les mans i qualsevol tipus de fomites, incloses superfícies i aliments,  $10^3$  partícules s'hi podrien transmetre (279). Aquest fet és d'especial rellevància durant la manipulació d'aliments com a mesura de control pels consumidors (171).

Quantitativament el rentat de mans solament amb aigua eliminaria entre un 0.5-1.5  $\text{Log}_{10}$  dels genomes de HuNoV (280), mentre que mitjançant la combinació amb sabó se n'assegura pràcticament una eliminació completa (281). Les bases etíliques (etanol 70%) resulten eficaces per la inactivació completa de microorganismes patògens com bacteris o virus que presentin un embolcall lipídic, però resulten insuficients per a HuNoV i d'altres virus sense embolcall, creant una falsa sensació de

protecció (282). En les guies de control establertes pels brots de norovirus de la CDC, EFSA, CDNA (Communicable Diseases Network Australia), PHE (Public Health England), entre d'altres, recomanen un rentat adequat mitjançant l'ús d'aigua i sabó per a la correcta desinfecció de mans, i que com a últim recurs, existiria la possibilitat d'utilitzar solucions fetes amb base d'etanol al  $\geq 70\%$  si no hi ha instal·lacions per rentar-se les mans adequadament (283–286).

Per altra banda, qualsevol superfície de contacte o material emprat durant la preparació d'aliments pot resultar també contaminat per la presència de HuNoV, fent imprescindible la seva higiene pel control de l'agent (287). Abans de la desinfecció és important la neteja de les superfícies i fomites per eliminar els compostos orgànics i inorgànics perquè podrien interferir en l'efectivitat del procés (195). Per la desinfecció es recomana utilitzar hipoclorit de sodi en un rang d'entre 0.1-0.5% (1000-5000 ppm) (283–285). Paral·lelament, la roba o els teixits emprats també s'han de considerar elements a tenir en compte per mantenir una bona higiene. Així, cicles de rentat de 60°C combinats amb la presència de detergent serien suficients per a l'eliminació de HuNoV (288).

Finalment, la manca de coneixements dels consumidors sobre les mesures de seguretat alimentària contribueix a una facilitat en l'aparició de noves infeccions, de manera que l'educació i l'adquisició d'habilitats i comportaments específics constitueixen oportunitats d'intervenció per mitigar-ne el risc. En conclusió, el comportament dels consumidors és alhora el nucli del problema i part de la solució.

### 1.10.3. Mesures per part de les autoritats competents

En les normatives publicades per la Comissió Europea (CE) sobre seguretat alimentària no s'hi inclou cap tipus de determinació d'agents vírics dins dels criteris microbiològics en aliments, aigües de consum i d'higiene dels processos, tot i destacar-ne la seva importància i preocupació (263, 264, 289). És necessària la recollecció de més dades que permetin quantificar i establir dels nivells màxims acceptables de HuNoV en les diverses matrius alimentàries i els processos relacionats, amb la finalitat de poder disposar definitivament d'una regulació en el seu control i poder protegir als consumidors (290).

Durant l'aparició de brots causats per HuNoV, agències de salut internacionals com la CDC estableixen una llista de recomanacions a tenir en compte per part de les institucions i usuaris afectats, per tal de minimitzar-ne i mitigar el seu abast. Aquestes mesures a dur a terme es divideixen entre recomanacions principals i secundàries.

D'entre les recomanacions principals i majoritàries a adoptar hi trobem:

- Evitar l'exposició a vòmits i diarrea.
- Aïllament dels casos que presentin símptomes de GEA dels asimptomàtics, en habitacions o sales separades. Una vegada els símptomes hagin remès, seguir mantenint els casos en un període mínim de 48 hores amb contacte limitat.
- Promoure activament la higiene de mans amb l'ús de sabó per part de totes les persones, fent èmfasi especialment després de tenir contacte o tractar amb els casos confirmats o sospitosos de GEA.
- Utilització d'EPI (Equips de Protecció Individual) com bates i guants per reduir la probabilitat d'exposició a vòmits i matèria

fecal, així com a d'altres elements que hagin estat en contacte amb afectats.

- Utilitzar una mascareta quirúrgica o equips de protecció facial si hi ha risc d'esquitxos a la cara durant la cura dels afectats, especialment entre els que vomiten.
- Incrementar la freqüència de neteja i desinfecció rutinàries de superfícies i equipaments ambientals que es toquen amb freqüència: comoditats, lavabos, aixetes, roba de llit, telèfons, panys, equips informàtics, comandaments, superfícies de preparació de cuina, entre d'altres que puguin complir aquestes característiques. Es precisa seguir un ordre de neteja ascendent de zones menys probables de contaminació per HuNoV a més probables.
- Excloure al personal treballador malalt durant un mínim de 48 hores després de la resolució dels símptomes.
- Establir cohorts entre els treballadors i casos. Assegurar-se que el personal que atengui una cohort no es mogui per altres.
- Excloure al personal no essencial, estudiants i voluntaris de les zones afectades de les instal·lacions durant el brot.
- Proporcionar educació als treballadors, pacients i visitants, inclòs el reconeixement dels símptomes de HuNoV, la prevenció de la infecció i els modes de transmissió.
- Notificació dels casos/brot als serveis sanitaris i epidemiològics.

D'entre les recomanacions secundàries principals s'hi troba:

- Considerar períodes més llargs d'aïllament entre els individus immunodeprimits afectats o amb trastorns del sistema immunitari, mares lactants i nens <2 anys. Els pacients amb aquestes o

altres comorbiditats tenen el potencial de recaure i provocar que les instal·lacions allarguin el període d'aïllament.

- Valorar la possibilitat d'evitar l'ús de mobles entapissats, cortines o catifes a les àrees de cura del pacient, ja que són objectes difícils de netejar i desinfectar completament.

Altres guies pel control de brots de HuNoV com la del PHE fan també èmfasi en la temperatura i temps mínims per la neteja de draps i baietes:  $\geq 71^{\circ}\text{C}$  durant 3 min o a  $65^{\circ}\text{C}$  10 minuts (285). Per altra banda, la CDNA comprèn un aïllament més llarg una vegada els símptomes han finalitzat, fins a 72 hores després (283).

Les autoritats sanitàries desenvolupen un paper crucial en el desenvolupament i implementació d'estratègies per la mitigació pel risc d'infeccions, així com promoure hàbits de comportament segurs. En el cas de Catalunya, dins de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA) existeixen unes pautes basades en les recomanacions de l'EFSA per tal d'establir quines accions es duran a terme en cas d'afectació al llarg de la cadena alimentària (291). En elles hi figuren:

- Establiment de mesures de control preventives al llarg de la cadena alimentària amb el compliment dels criteris microbiològics establerts en el Reglament (CE) núm. 2073/2005.
- Elaboració d'un pla de neteja i desinfecció específic amb l'ús de clor lliure a concentracions superiors a  $>1000$  ppm durant 5 minuts o tractament equivalent.
- Neteja i desinfecció dels vegetals i hortalisses amb clor a una concentració de 200 ppm o amb PAA a 150-250 mg/L.
- Restriccions d'assistència sobre treballadors malalts.
- Higiene rigorosa de mans.
- Formació sobre el personal treballador i supervisió.

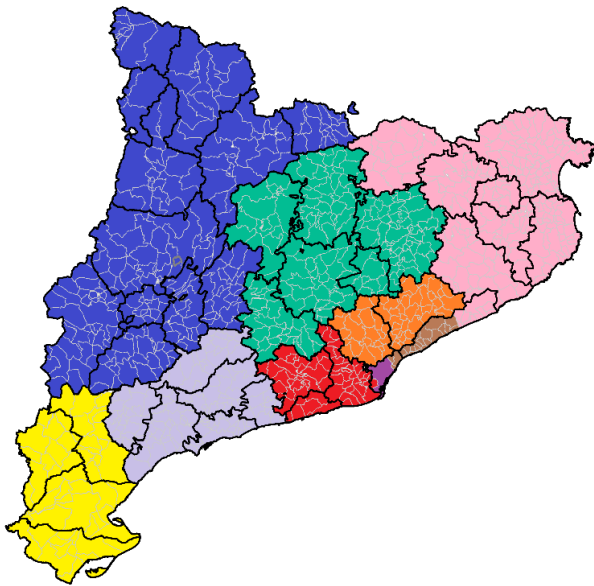


Per altra banda, des de l'Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT) també existeixen protocols recomanats davant d'un brot epidèmic de GEA, definint-se com a cas aquella persona que presenti en un període de 24h més de dos episodis de diarrea o vòmits. Entre les recomanacions s'hi inclouen part de les ja anomenades, com són:

- Utilitzar EPIs per manipular els malalts i superfícies brutes.
- Netejar immediatament superfícies brutes de diarrea o vòmits amb lleixiu, i augmentar la freqüència de les neteges rutinàries.
- Rentar-se les mans amb abundant aigua i sabó després de tocar malalts i superfícies brutes, i assecar-se-les amb tovallola de paper o assecador automàtic. Es recomana no utilitzar ni compartir tovalloles de roba.
- El personal malalt s'ha d'abstenir immediatament de treballar almenys fins trobar-se durant 48 hores lliure de símptomes, on en cas de ser manipulador d'aliments es recomana restar fora del treball una setmana.
- Emfatitzar la higiene, rentat de mans en els visitants, abans i després de la visita.
- La roba bruta de vòmits o diarrea s'ha de plegar evitant fer pols, sense sacsejar-la, posar-la en bosses i rentar-la amb aigua calenta i lleixiu. Això inclou roba de vestir, de llit, cortines i catifes.
- Evitar si és possible o restringir el moviment de residents i treballadors d'una zona afectada a una zona no afectada on no hi hagi malalts.

A Catalunya, les diverses Unitats de Vigilància Epidemiològica (UVE) distribuïdes pel país són les encarregades de decretar l'aparició de brots de HuNoV. Estan formades per UVE Girona, UVE Catalunya Central, UVE

Lleida i Alt Pirineu i Aran, UVE Terres de l'Ebre, UVE Camp de Tarragona, UVE Vallès Occidental i Oriental, UVE Barcelonès Nord i Maresme, UVE Barcelona Sud i l'Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB), totes ellss coordinades per l'ASPCAT (**Figura 12**).



**Figura 12.** Mapa de les UVE de Catalunya. UVE Lleida i Alt Pirineu i Aran (blau), UVE Terres de l'Ebre (groc), UVE Camp de Tarragona (gris), UVE Barcelona Sud (vermell), UVE Catalunya Central (verd), UVE Vallès Occidental i Oriental (taronja), UVE Barcelonès Nord i Maresme (marró), UVE Girona (rosa) i Agència de Salut Pública de Barcelona (lila). Elaboració pròpia.

Durant l'aparició d'un brot les diverses UVE duen a terme una recollecció de dades epidemiològiques per part dels centres i institucions afectades com en són: durada, localització, nombre de persones exposades, nombre d'afectats, informació de la simptomatologia dels afectats i d'altres característiques com l'edat o sexe; amb la conseqüent recollida de mostres.

#### 1.10.4. Vacunació

HuNoV té un important impacte a nivell econòmic, sanitari i social posant de manifest la necessitat de mesures preventives que també incloguin vacunes o antivirals. Fins al moment, la recerca bàsica sobre HuNoV ha patit les limitacions causades per una manca de línies cel·lulars adequades per al cultiu i de models animals profitosos (292, 293).

La incidència i grau d'afectació de la malaltia no és la mateixa en totes les franges d'edat, o si es disposa de patologies prèvies que poden afectar al correcte funcionament del sistema immunitari. Així, els grups que inclouen infants  $\leq 5$  anys i adults  $\geq 65$  anys i pacients immunodeprimits són els més urgents per poder disposar de mesures preventives com la vacunació (294). Altres poblacions addicionals en risc de transmissió de la malaltia, i per tant també potencials a tenir en compte en la vacunació, són aquelles que treballen a la indústria alimentària, a l'atenció sanitària, en la cura d'infants i en el servei i preparació d'aliments (295).

El GI de HuNoV és responsable d'un 10% dels casos de la malaltia per GEA, mentre que el 90% són atribuïbles al GII i en  $<0.1\%$  a GIV (296). Conseqüentment, l'elevada diversitat de genotips entre cadascun dels genogrups i la constant evolució i recombinació que pateixen representa una dificultat per trobar una vacuna universal (297), que hauria de presentar una àmplia protecció multivalent entre ells (298).

Actualment hi ha dos tipus de vacunes en vies de desenvolupament, les produïdes a través de VLP i en estadi clínic, i les produïdes a partir de partícules P, en estadi pre-clínic. Les primeres imiten l'organització i conformació de les partícules víriques però sense el genoma. Per contra,

les partícules P són nanopartícules formades per còpies del domini P de la proteïna VP1 (299, 300).

Aquestes vacunes en desenvolupament han estat capaces de mostrar una resposta immunològica en hostes adults, tot i que hi ha qüestions que romandrien per ser comprovades. Una d'elles és si són capaces de protegir contra tots els genotips de HuNoV i si són efectives per tots els grups d'edat, en especial als nens més petits; conèixer la resposta en pacients immunodeprimits i quina és la durada de la protecció induïda per les vacunes. Només quan es resolguin aquests plantejaments serà possible establir uns criteris i un calendari eficaç de vacunació contra HuNoV i conèixer si la vacuna pot ser cost-eficaç (301).



# OBJECTIUS



## Objectius

L'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral és caracteritzar l'impacte dels brots produïts per norovirus al nostre país i investigar possibles millores de les opcions adreçades a controlar i reduir aquest impacte.

Els objectius específics proposats s'agrupen en tres blocs:

1. Investigar les característiques epidemiològiques i els genotips responsables dels brots de GEA per HuNoV en institucions tancades o semi-tancades (residències geriàtriques, centres socio-sanitaris, hospitals, guarderies, centres escolars, hotels, altres).
2. Avaluar la presència de HuNoV en mostres de saliva d'individus infectats, i estudiar la relació entre diversos factors (simptomatologia, estat secretor i edat) amb la seva presència a la saliva.
3. Dur a terme estudis de supervivència i inactivació vírica per a determinar l'efecte en els hàbits del consumidor més crítics per a la seguretat alimentària sobre el risc d'infecció per HuNoV.





**INFORME  
DELS ARTICLES**



## Informe dels articles

### 1. Llistat d'articles inclosos a la tesi

Els articles que formen part de la memòria de la Tesi Doctoral presentada per Eduard Anfruns Estrada han estat publicats a revistes internacionals en el camp de la Virologia indexades en el *Journal Citation Reports*.

#### Article I

**Anfruns-Estrada E, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia (PI16/02005). “Epidemiological and genetic characterization of Norovirus outbreaks occurred in Catalonia, Spain, 2017-2019”. *Viruses*. 2022;14(3):488. doi: 10.3390/v14030488.**

#### Article II

**Anfruns-Estrada E, Sabrià A, Fuentes C, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia (PI16/02005). “Detection of norovirus in saliva samples from acute gastroenteritis cases and asymptomatic subjects: association with age and higher shedding in stool”. *Viruses*. 2020;12(12):1369. doi: 10.3390/v12121369.**

La revista *Viruses* es troba al segon quartil en l'àrea Virology amb un factor d'impacte de 5.048 l'any 2020.

Article III

**Anfruns-Estrada E<sup>†</sup>, Bottaro M<sup>†</sup>, Pintó RM, Guix S, Bosch A. “Effectiveness of consumers washing with sanitizers to reduce human norovirus on mixed salad”. Foods. 2019;8(12):637. doi: 10.3390/foods8120637.**

<sup>†</sup>Equally contribution

La revista *Foods* es troba al segon quartil en l'àrea Food Science & Technology amb un factor d'impacte de 4.092 l'any 2019.

Directora i tutora



**Dra. Susana Guix Arnau**

Director



**Dr. Albert Bosch Navarro**

Barcelona, 2022

## 2. Informe de coautoria dels articles publicats

### Article I

**Anfruns-Estrada E**, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia (PI16/02005). **“Epidemiological and genetic characterization of Norovirus outbreaks occurred in Catalonia, Spain, 2017-2019”**. Viruses. 2022;14(3):488. doi: 10.3390/v14030488.

### Article II

**Anfruns-Estrada E**, Sabrià A, Fuentes C, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia (PI16/02005). **“Detection of norovirus in saliva samples from acute gastroenteritis cases and asymptomatic subjects: association with age and higher shedding in stool”**. Viruses. 2020;12(12):1369. doi: 10.3390/v12121369.

Els articles I i II van ser finançats per l'Institut de Salut Carlos III a través del projecte PI16/02005 (cofinançat pel Fons Europeu de Desenvolupament Regional "Investing in your future") i l'Agència Catalana per la Gestió de Beques per la Universitat (número de subvenció AGAUR 2017/SGR 1342). El doctorand ha dut a terme la part experimental i d'investigació dels treballs, així com l'anàlisi i interpretació dels resultats participant activament en la redacció dels manuscrits sota la supervisió dels directors. Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Article III

**Anfruns-Estrada E<sup>†</sup>, Bottaro M<sup>†</sup>, Pintó RM, Guix S, Bosch A. “Effectiveness of consumers washing with sanitizers to reduce human norovirus on mixed salad”. Foods. 2019;8(12):637. doi: 10.3390/foods8120637.**

<sup>†</sup>Equally contribution

L'article III va ser finançat pel projecte número 727580 del programa Horizon 2020 European Union. Junt amb M. Bottaro, el doctorand ha dut a terme la part experimental i d'investigació del treball, així com l'anàlisi i interpretació dels resultats sota la supervisió dels directors. M. Bottaro ha utilitzat part de les dades del treball per a l'elaboració de la seva tesi doctoral a la Universita' Degli Studi Di Bari Aldo Moro.

Directora i tutora



**Dra. Susana Guix Arnau**

Director



**Dr. Albert Bosch Navarro**

Barcelona, 2022

# ARTICLE I





## Article I: Epidemiological and genetic characterization of Norovirus outbreaks occurred in Catalonia, Spain, 2017-2019

Anfruns-Estrada E, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005).

Viruses. 2022;14(3):488. doi: 10.3390/v14030488.

El genoma de HuNoV s'organitza en tres ORF, on una superposició de l'ORF1 i l'ORF2 pot conduir a recombinacions entre genotips i a l'aparició de noves soques que contenen diferents RdRp i VP1. D'aquesta manera, la diversitat de genotips circulants existents es representa amb un enfocament de tipificació dual amb informació corresponent a ambdues proteïnes.

La variant GII.4 Sydney 2012 va sorgir el 2012 i des de llavors no ha evolucionat a nivell antigènic de la càpsida, malgrat això, l'any 2015 va aparèixer una nova variant de GII.4 Sydney 2012 recombinant amb la RdRp GII.P16 (GII.4[P16]) als EUA i que posteriorment va estendre's a altres continents. De la mateixa manera el genotip GII.2[P16] sorgit el 2016 a Alemanya, o el genotip GII.17[P17] al sud-est asiàtic durant l'hivern del 2014-2015 han estat responsables d'un gran número de casos i brots durant aquesta dècada.

Els objectiu d'aquest article van ser:

- Estudiar l'epidemiologia dels brots de HuNoV declarats a Catalunya en comunitats tancades i semi-tancades durant el període 2017-2019.

- Descriure i analitzar la prevalença i la diversitat genètica dels diferents genotips implicats en els brots de HuNoV.

Durant l'estudi d'aquests 3 anys es van incloure un total de 100 brots de HuNoV a l'estudi on un 70% d'ells va ser causat pel GII. El genotip GII.4[P31] Sydney 2012 va ser el més predominant identificat en 14 brots, seguidament de GII.4[P16] Sydney 2012 i GII.2[P16] en 12; mostrant un augment en la diversitat de genotips contraposada a l'últim estudi de genotips de HuNoV del 2010-2012 a Catalunya.

Gairebé la meitat dels brots es van produir a les residències, on els convivents representen un grup vulnerable a la infecció. No obstant, la durada més llarga dels brots de l'estudi es va associar significativament en els àmbits de les escoles infantils o guarderies. Entre els modes de transmissió, el p/p es va identificar en el 74% dels brots com la via més comuna per adquirir una infecció per HuNoV, seguidament de la transmissió alimentària en un 24%. Les taxes d'atac més elevades es van relacionar amb la transmissió per aliments, tot i que la durada mitjana dels brots va ser significativament menor.

El genotip de la càpsida GII.4 Sydney 2012 va afectar principalment a residències d'avis a través d'una transmissió p/p, a diferència del GII.2[P16] i GI.3[P3] que es va produir amb més freqüència als albergs/campaments juvenils associats a la transmissió a través d'aliments. La taxa d'atac mitjana va ser significativament més alta quan es comparava GII.2[P16] amb GI.4[P4] i GII.4[P31] Sydney 2012, i també GII.6[P7] i GII.4[P31] Sydney 2012. Paral·lelament, durant els mesos d'hivern hi va haver un augment dels brots de HuNoV, on el GII hi mostrava una estacionalitat més marcada que no pas GI. Només els






genotips GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4[P16], GII.4[P31] i GII.17[P17] es van detectar de manera consistent durant els 3 anys d'estudi. D'aquests, el GII.2[P16] va mostrar una tendència negativa al llarg del temps.

La caracterització molecular de la distribució geogràfica i temporal dels genotips afavoreix la comprensió de les característiques virals que poden afectar la patologia i la transmissió de HuNoV, i també n'il·lustra els patrons evolutius distintius. D'aquesta manera, una vigilància prematura pot ajudar a reduir l'impacte global de la malaltia.



## Article

# Epidemiological and Genetic Characterization of Norovirus Outbreaks That Occurred in Catalonia, Spain, 2017–2019

Eduard Anfruns-Estrada <sup>1,2</sup>, Sara Sabaté <sup>3</sup>, Efrén Razquin <sup>3</sup>, Thais Cornejo Sánchez <sup>4</sup>, Rosa Bartolomé <sup>4</sup>, Nuria Torner <sup>5,6</sup>, Conchita Izquierdo <sup>5</sup>, Nuria Soldevila <sup>6,7</sup>, Lorena Coronas <sup>6,7</sup>, Àngela Domínguez <sup>6,7</sup>, Cristina Fuentes <sup>1,2</sup>, Rosa M. Pinto <sup>1,2</sup>, Albert Bosch <sup>1,2</sup>, Susana Guix <sup>1,2,\*</sup>  
and The Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005) <sup>†</sup>

- <sup>1</sup> Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; eanfruns@ub.edu (E.A.-E.); cfuentes@ub.edu (C.F.); rpinto@ub.edu (R.M.P.); abosch@ub.edu (A.B.)
  - <sup>2</sup> Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
  - <sup>3</sup> Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB), 08023 Barcelona, Spain; ssabate@aspb.cat (S.S.); erazquin@aspb.cat (E.R.)
  - <sup>4</sup> Microbiology Laboratory, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; tcornejosan@gmail.com (T.C.S.); rbartolome@vhebron.net (R.B.)
  - <sup>5</sup> Department of Health, Generalitat of Catalonia, 08005 Barcelona, Spain; nuria.torner@gencat.cat (N.T.); conchita.izquierdo@gencat.cat (C.I.)
  - <sup>6</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; nsoldevila@ub.edu (N.S.); coronas@ub.edu (L.C.); angela.dominguez@ub.edu (À.D.)
  - <sup>7</sup> Department of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- \* Correspondence: susanaguix@ub.edu; Tel.: +34-9340-21490  
<sup>†</sup> Membership of the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005) is provided in the Acknowledgments.



**Citation:** Anfruns-Estrada, E.; Sabaté, S.; Razquin, E.; Cornejo Sánchez, T.; Bartolomé, R.; Torner, N.; Izquierdo, C.; Soldevila, N.; Coronas, L.; Domínguez, À.; et al. Epidemiological and Genetic Characterization of Norovirus Outbreaks That Occurred in Catalonia, Spain, 2017–2019. *Viruses* **2022**, *14*, 488. <https://doi.org/10.3390/v14030488>

Academic Editors: Joana Rocha-Pereira and Carmen Mirabelli

Received: 28 January 2022  
Accepted: 23 February 2022  
Published: 27 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Molecular characterization of human norovirus (HuNoV) genotypes enhances the understanding of viral features and illustrates distinctive evolutionary patterns. The aim of our study was to describe the prevalence of the genetic diversity and the epidemiology of the genotypes involved in HuNoV outbreaks in Catalonia (Spain) between 2017 and 2019. A total of 100 HuNoV outbreaks were notified with the predominance of GII (70%), followed by GI (27%) and mixed GI/GII (3%). Seasonality was observed for GII outbreaks only. The most prevalent genotypes identified were GII.4[P31] Sydney 2012, GII.4[P16] Sydney 2012 and GII.2[P16]. As compared to person-to-person (P/P) transmitted outbreaks, foodborne outbreaks showed significantly higher attack rates and lower duration. The average attack rate was higher in youth hostel/campgrounds compared to nursing homes. Only genotypes GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4[P16], GII.4[P31] and GII.17[P17] were consistently detected every year, and only abundance of GII.2[P16] showed a negative trend over time. GII.4 Sydney 2012 outbreaks were significantly associated to nursing homes, while GII.2[P16] and GI.3[P3] were most frequently identified in youth hostel/campgrounds. The average attack rate was significantly higher when comparing GII.2[P16] vs. GI.4[P4], GII.2[P16] vs. GII.4[P31] Sydney 2012, and GII.6[P7] vs. GII.4[P31] Sydney 2012. No correlations were found between genotype and outbreak duration or age of affected individuals.

**Keywords:** human norovirus; acute gastroenteritis outbreaks; molecular epidemiology; Spain; genotyping; viral diversity

## 1. Introduction

Enteric viruses are the most common cause of acute gastroenteritis. Specifically, human noroviruses (HuNoV) are recognized as the most prevalent agent, causing approximately 17–18% of the total diarrheal diseases and 200,000 annual deaths [1,2]. They also represent

the leading cause of gastroenteritis outbreaks worldwide affecting all age groups, being mainly transmitted via an oral-fecal route [3] and with a seasonal pattern, as most of the outbreaks occur within cold months of the year [4].

The genome of HuNoV is organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes for non-structural proteins including RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and subsequently ORF2 and ORF3 encode for structural proteins VP1 (major viral protein) and VP2 (minor viral protein), respectively [5]. Recombination between the overlap of ORF1 and ORF2 can occur, and this can lead to the appearance of novel strains containing different RdRp and VP1 combinations [6,7]. The diversity of existing circulating genotypes, including recombinant strains, is represented with a dual typing approach with information from both RdRp and VP1 proteins to allow a better follow-up of HuNoV strain evolution [8].

A classification of HuNoV into 10 genogroups is currently accepted. Genogroup II (GII) accounts for the largest number of infections followed by genogroup I (GI) [9], and, to a much lesser extent, GIV, GVIII and GIX. GI includes 9 VP1 (GI.1–GI.9) and 14 RdRp (GI.P1–GI.P14) different genotypes, and GII includes 26 VP1 (GII.1–GII.14, GII.16–GII.27) and 37 RdRp (GII.P1–GII.P8, GII.P11–GII.P13, GII.P15–GII.P18, GII.P20–GII.P41) genotypes [10].

Within genogroup II, capsid genotype 4 (GII.4) has been the most predominant worldwide for more than the last 20 years [11], with distinct variants emerging periodically every 2–3 years and replacing the previous circulating variant. Variant GII.4 Sydney 2012 emerged in 2012 and has not evolved since then at the capsid antigenic level [8]. Despite this, in 2015, a novel variant of GII.4 Sydney 2012 recombinant with GII.P16 RdRp (GII.4[P16]) appeared in USA [12], suggesting that RdRp mutations may also provide a higher fitness. Since its emergence, GII.4[P16] has been spread widely to many countries including Germany, Canada, Australia, New Zealand and Brazil, resulting in the leading genotype implicated in HuNoV outbreaks in those regions [13–16]. Conversely, GII.P16 also occurs in association with GII.2 capsid (GII.2[P16]), a genotype that emerged in 2016, and it has also been responsible for the majority of outbreaks during winter 2016–2017 in Germany, Taiwan, Thailand and China [17–20]. Moreover, during winter 2014–2015, a novel genotype GII.17[P17] emerged in southeast Asia, being implicated in a large number of cases in the area [21] and rapidly extended to other continents [8,22]. However, since 2017, the prevalence of GII.17[P17] appeared to be greatly diminished [8,23,24].

The molecular characterization of the geographical and temporal distribution of a genotype enhances the understanding of viral features, which may affect HuNoV pathology and transmission, and it also illustrates the distinctive evolutionary patterns of HuNoV [25,26]. Before a genotype becomes pandemic, it usually circulates for several years, and, therefore, premature surveillance can help to reduce the overall burden of the disease [24,27].

The main purpose of the study was to describe and analyse the prevalence and the genetic diversity of the different genotypes involved in HuNoV outbreaks between 2017 and 2019 in Catalonia, the second most populated region in Spain with 7.7 million inhabitants. The study also provides information regarding the epidemiology of the declared outbreaks, to test the hypothesis of whether associations between HuNoV genotype and epidemiological characteristics of outbreaks existed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection

Human stool samples were collected from affected individuals during HuNoV outbreaks reported in Catalonia (Spain) through January 2017 to December 2019 in closed and semi-closed settings such as nursing homes, youth/campgrounds, long-term care facilities, schools and other institutions. All epidemiological data were collected by the different Epidemiologic Surveillance Units belonging to the Public Health Agency of Catalonia (ASPCAT). This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099).

## 2.2. HuNoV RTqPCR and Genotyping Assays

The presence of HuNoV in stool was assessed by real-time RTqPCR at the Microbiology Laboratory at Hospital Universitari Vall d'Hebron and the Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB) [28]. Viral RNA was extracted from a 10% stool suspension using the NucliSENS® easyMAG® system (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France), and the presence of HuNoV was assessed by RTqPCR according to ISO 15216-2:2019 [29].

A semi-nested RT-PCR at the Enteric Virus Laboratory (University of Barcelona) targeting ORF1 and ORF2 genes, including RdRp and VP1, was used for genotyping [8], considering 2–4 positive specimens randomly selected from each outbreak. RT-PCR products were purified and sequenced on an ABI Prism 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Genotypes were assigned for RdRp and VP1 using the Norovirus Typing Tool (version 2.0) [30]. Phylogenetic analysis was performed using the neighbour-joining method (distance calculation by the Kimura-2-parameter correction; pairwise deletion) implemented in the MEGA7 program [31], and results were validated by 1000 bootstrap replicates.

## 2.3. Statistical Analysis

Chi-square test was used to compare categorical variables by OpenEpi website. Comparisons between means were performed using ANOVA analysis by the Good Calculators website. In addition,  $p$ -values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

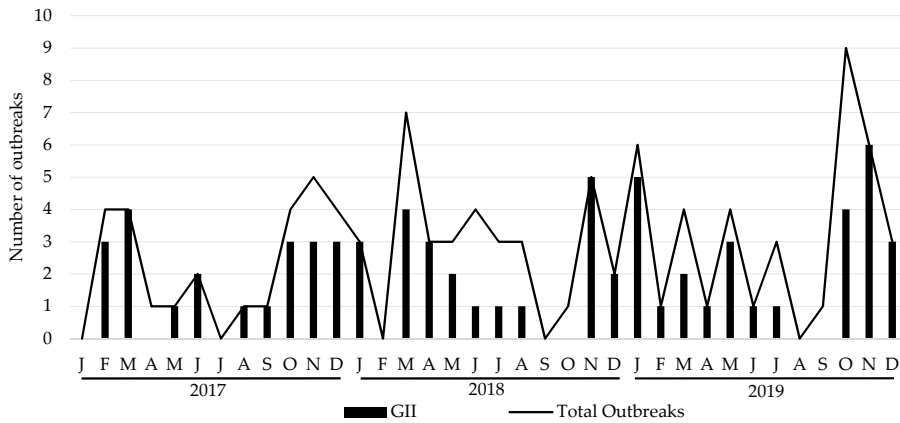
## 3. Results

### 3.1. Epidemiological Features of HuNoV Outbreaks and Cases

During the study period, a total of 100 HuNoV outbreaks were reported to the Public Health authorities. The total number of outbreaks increased every year, resulting in 27 outbreaks in 2017, 34 in 2018 and 39 in 2019. GII was the predominant genogroup, being involved in 70 outbreaks, followed by GI in 27 and mixed genogroups GI and GII in 3. Monthly distribution of total outbreaks also exhibited a pronounced seasonality with a higher occurrence during cold months (October–March) rather than warm months (April–September) (Figure 1). Information about the outbreak size was reported for 83 of them. Eleven outbreaks affected  $>50$  cases (six in 2017, one in 2018 and three in 2019) and one  $>250$  cases (2017). The main epidemiological features of the studied outbreaks are summarized in Tables 1 and 2. Average attack rates were significantly higher in foodborne outbreaks as compared to person-to-person (P/P) transmitted outbreaks (45.76% vs. 29.71%,  $p = 0.0106$ ), but duration of outbreak was significantly lower (3.20 vs. 8.93 days,  $p = 0.001$ ). Regarding outbreaks occurring at different settings, differences in mode of transmission were observed between hotels and nursing homes ( $p < 0.003$ ), hotels and schools ( $p = 0.049$ ), and between youth hostel/campgrounds compared with nursing homes ( $p < 0.001$ ) and schools ( $p = 0.0037$ ). Similarly, nursing home outbreaks occurred with a significant higher frequency during cold months, as compared to outbreaks occurring in youth hostel/campgrounds ( $p < 0.001$ ). The average attack rate was significantly higher in youth hostel/campgrounds, as compared to nursing homes (49.22% vs. 28.62%,  $p = 0.013$ ). In addition, a kindergarten/preschool setting showed a significantly longer duration when comparing it with youth hostel/campgrounds ( $p = 0.0059$ ) and hotels ( $p = 0.0077$ ). No significant association was observed between genogroup and mode of transmission. Modes of transmission for GI outbreaks were 77.8% P/P and 22.2% foodborne; for GII outbreaks were 72.9% P/P, 25.7% foodborne and 1.4% waterborne; and for mixed GI/GII outbreaks were 66.7% P/P and 33.3% foodborne.

Symptom information was collected for 533 HuNoV cases (Table 3). Diarrhea presented at a significantly higher frequency in patients older than 65, as compared to patients younger than 15 and to 16–65 age group ( $p < 0.001$ ), and in patients from 16–65 age group compared to patients younger than 15 ( $p < 0.001$ ). Vomiting and fever were significantly less frequent in patients older than 65 years as compared to patients younger than 15 or 16–65 age group ( $p < 0.001$ ). Fever was very rare in patients older than 65.





**Figure 1.** Monthly distribution of total and GII number of HuNoV outbreaks, 2017–2019. J: January; F: February; M: March, A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December.

**Table 1.** Main epidemiological features of outbreaks included in the study, by mode of transmission.

Mode of Transmission	Total Outbreaks	Duration of the Outbreak (Days) <sup>a</sup>	Total Number of Affected Individuals	Mean of Affected Individuals per Outbreak	Average Attack Rate (%) <sup>a</sup>
P/P	74	8.93 ± 6.31 <sup>b</sup>	1795 <sup>c</sup>	29.42 ± 18.13 <sup>c</sup>	29.71 ± 20.85 <sup>c</sup>
Foodborne	22	3.20 ± 2.54 <sup>d</sup>	696 <sup>e</sup>	38.66 ± 65.13 <sup>e</sup>	45.76 ± 26.66 <sup>e</sup>
Foodborne + P/P	3	4.33 ± 4.16	145	48.33 ± 32	48.12 ± 18.96
Waterborne	1	4	41	41	64

P/P person to person; <sup>a</sup> Results are expressed as the mean ± standard deviation <sup>b</sup> Information of 59 outbreaks <sup>c</sup> Information of 61 outbreaks <sup>d</sup> Information of 15 outbreaks <sup>e</sup> Information of 18 outbreaks.

**Table 2.** Main epidemiological features of outbreaks included in the study, by setting.

Setting	Total Outbreaks	Mode of Transmission	Season	Duration of the Outbreak (Days) <sup>a</sup>	Total Number of Affected Individuals	Average Attack Rate (%) <sup>a</sup>
Nursing home	48	P/P (43), Foodborne (4), Foodborne + P/P (1)	Cold (42), warm (6)	8.86 ± 5.89 <sup>b</sup>	1208 <sup>c</sup>	28.62 ± 20.03 <sup>c</sup>
Youth hostel/ Campground	20	Foodborne (12), P/P (5), Foodborne + P/P (2), Waterborne (1)	Warm (12), cold (8)	3.18 ± 2.86 <sup>d</sup>	537 <sup>e</sup>	49.22 ± 22.42 <sup>e</sup>
School	13	P/P (11), Foodborne (2)	Cold (8), warm (5)	9.55 ± 6.25 <sup>f</sup>	637 <sup>f</sup>	32.61 ± 23.21 <sup>f</sup>
Kindergarten/ Preschool	6	P/P (6)	Cold (5), warm (1)	12.50 ± 9.09	40 <sup>g</sup>	23.43 ± 6.16 <sup>g</sup>
Hotel	6	Foodborne (4), P/P (2)	Cold (3), warm (3)	3.40 ± 3.71 <sup>h</sup>	113 <sup>h</sup>	39.12 ± 35.86 <sup>h</sup>
Long-term care facility	6	P/P (6)	Warm (4), cold (2)	9.33 ± 2.08 <sup>g</sup>	131 <sup>i</sup>	35.13 ± 29.17 <sup>i</sup>
Hospital	1	P/P (1)	Warm (1)	3	11	17

P/P person to person <sup>a</sup> Results are expressed as the mean ± standard deviation <sup>b</sup> Information of 35 outbreaks <sup>c</sup> Information of 41 outbreaks <sup>d</sup> Information of 17 outbreaks <sup>e</sup> Information of 18 outbreaks <sup>f</sup> Information of 11 outbreaks <sup>g</sup> Information of 3 outbreaks <sup>h</sup> Information of 5 outbreaks <sup>i</sup> Information of 4 outbreaks.

**Table 3.** Distribution of cases according to symptoms and age group.

Symptom	<15 Years	16–65 Years	>65 Years
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Diarrhea	123 (61.5)	113 (83.1)	147 (96.7)
Vomiting	196 (91.6)	121 (88.3)	110 (70.1)
Fever	75 (39.9)	53 (47.3)	7 (0.1)

### 3.2. Prevalence and Evolution of HuNoV Genotypes

Dual genotype information could be obtained from 202 samples of 93 outbreaks. Regarding RdRp, six genotypes were identified combined with GI (P1, P3, P4, P5, P11 and P13), and 10 with GII (P4, P7, P8, P16, P17, P21, P30, P31, P33 and P40). For VP1, six genotypes were identified for GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.5 and GI.6) and 10 for GII (GII.1, GII.2, GII.4, GII.5, GII.6, GII.8, GII.10, GII.14 and GII.17). Combined circulating genotypes for GI were GI.1[P1], GI.3 was found to be associated with both P3 and P13 (GI.3[P3] and GI.3[P13]), GI.4[P4], GI.5 with P4 and P5 (GI.5[P4] and GI.5[P5]) and GI.6[P11]. For GII, GII.1[P33], GII.2[P16], GII.3 was associated with P21 and P30 (GII.3[P21] and GII.3[P30]); GII.4 was found to be associated with P4, P16 and P31 (GII.4[P4], GII.4[P16] and GII.4[P31]), GII.5[P40], GII.6[P7], GII.8[P8], GII.10[P16], GII.14[P7] and GII.17[P17].

The most prevalent genotypes identified in this study were GII.4[P31] Sydney 2012 being isolated in 14 outbreaks, and each GII.4[P16] Sydney 2012 and GII.2[P16] in 11. For GI, both GI.4[P4] and GI.3[P3] were identified in six outbreaks. Only genotypes GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4[P16] Sydney 2012, GII.4[P31] Sydney 2012 and GII.17[P17] were detected all the years of the study period (Table S1). The number and evolution of sequence identification per trimester over the study period are illustrated in Figure 2.

No strong correlations were observed when analysing epidemiological features according to genotype (Table 4). The average attach rate was significantly higher when comparing GII.2[P16] and GI.4[P4] (55.56% vs. 18.23%,  $p = 0.01$ ), GII.2[P16] and GII.4[P31] Sydney 2012 (55.56% vs. 21.24%,  $p = 0.021$ ), and GII.6[P7] and GII.4[P31] Sydney 2012 (51.24% vs. 21.24%,  $p = 0.047$ ). No other genotype correlations were found with either the duration of the outbreaks or with the mean age of affected individuals. Although not statistically significant, GI outbreaks were less influenced by season as compared to GII outbreaks ( $p = 0.058$ ).

Overall, GII.4 Sydney 2012 outbreaks were significantly associated with nursing homes ( $p = 0.002$ ). Furthermore, GII.2[P16] ( $p = 0.008$ ) and GI.3[P3] ( $p = 0.015$ ) were most frequently identified in youth hostel/campgrounds.

### 3.3. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis confirmed genotype assignment performed using a Norovirus Typing Tool (version 2.0) (Figure 3). Information of 77 of the 93 genotyped outbreaks is shown in the phylogenetic trees.

Four amino acid substitutions not previously described were detected in four samples within the RdRp coding region (Table 5). P1617S (VV165.19/8 GI.P1), L1769F (RSBS87.17/1787126, GI.P11) represented in Figure 3A, L1638R (RSBS74.17/1774004, GII.P16) represented in Figure 3C and P1644T (ASPB140.17/1, GII.P31) represented in Figure 3E.

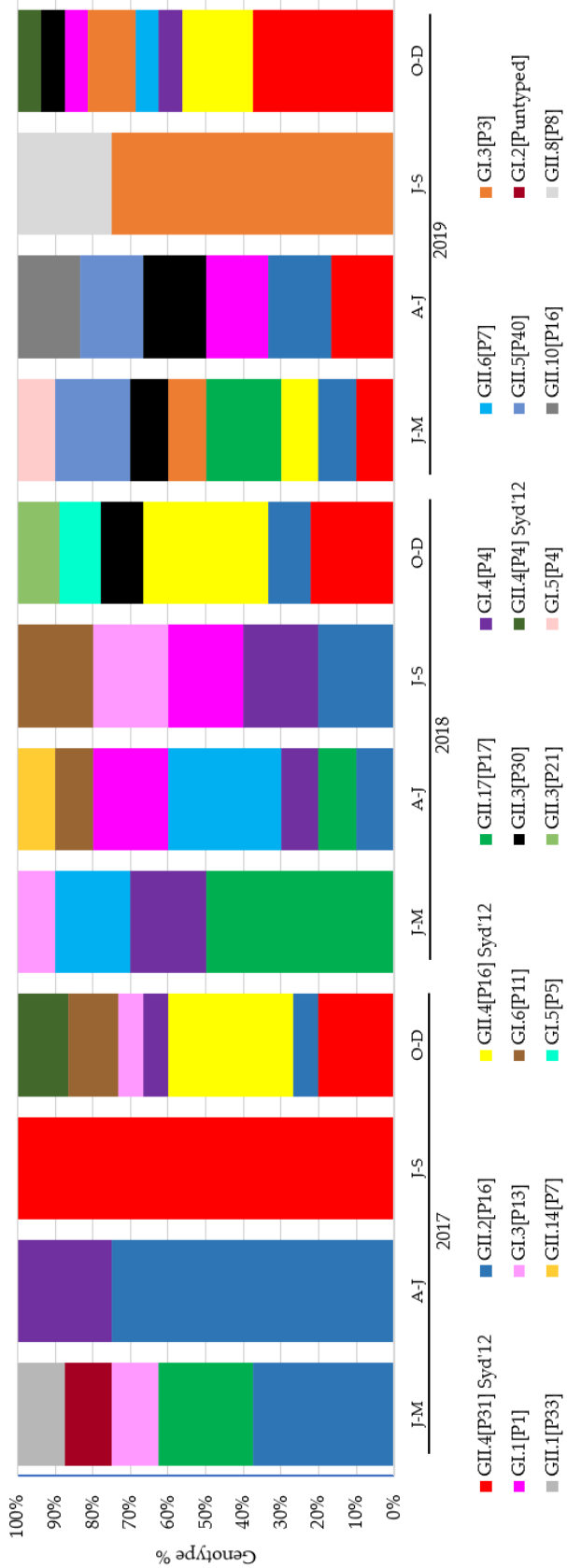


Figure 2. Distribution of genotypes identified per month of 93 typed outbreaks reported during 2017–2019. No outbreaks reported in January, July and August in 2017; February, September in 2018; and August in 2019.

**Table 4.** Main epidemiological features of the outbreaks included in the study, according to genotype.

Genotype	Total Outbreaks	Setting (Number of Outbreaks)	Mode of Transmission	Season	Mean Age of Cases (Years)	Duration of Outbreak (Days)	Total Number of Affected Individuals	Average Attack Rate (%) <sup>a</sup>
GI.1[P1]	5	Long-term care facility (2), Youth hostel/Campground (2), Hotel (1)	P/P (3), Foodborne (2)	Warm (4), Cold (1)	36.66 ± 20.56	6 ± 5.23 <sup>b</sup>	107 <sup>b</sup>	28.35 ± 30.84 <sup>b</sup>
GI.3[P3]	6	Youth hostel/Campground (4), Nursing home (2)	P/P (3), Foodborne (3)	Warm (3), Cold (3)	46.71 ± 33.12 <sup>b</sup>	7.67 ± 4.62 <sup>c</sup>	189	36.93 ± 17.96
GI.3[P13]	2	Youth hostel/Campground (1), School (1)	P/P (1), Foodborne (1)	Cold (1), Warm (1)	19.48 ± 11.72	5.5 ± 3.54	45	48 ± 1.41
GI.4[P4]	6	Nursing home (3), School (2), Hotel (1)	P/P (6)	Cold (3), Warm (3)	43.08 ± 29.89	9.4 ± 8.52 <sup>b</sup>	115 <sup>b</sup>	18.23 ± 17.68 <sup>b</sup>
GI.5[P4]	1	Nursing home (1)	P/P (1)	Cold (1)	62.8	2	18	11.69
GI.5[P5]	1	Nursing home (1)	P/P (1)	Cold (1)	71.31	7	28	17.18
GI.6[P11]	3	Nursing home (2), Youth hostel/Campground (1)	P/P (3)	Warm (2), Cold (1)	52.3 ± 31.74	7 ± 5.29	135	36.34 ± 8.47
Multiple GI genotypes <sup>k</sup>	1	Nursing home (1)	P/P (1)	Cold (1)	60.72	17	59	83.1
Total GI	25	Nursing home (10), Youth hostel/Campground (8), School (3), Long-term care facility (2), Hotel (2)	P/P (19), Foodborne (6)	Cold (13), Warm (12)	41.85 ± 26.8 <sup>b</sup>	7.73 ± 6.13 <sup>d</sup>	721 <sup>e</sup>	30.71 ± 21.93 <sup>e</sup>
GI.1[P33]	1	School (1)	P/P (1)	Cold (1)	9.81	9	45	12.47
GI.2[P16]	11	Youth hostel/Campground (6), Nursing home (3), School (1), Hotel (1)	P/P (5), Foodborne (3), Foodborne+ P/P (2), Waterborne (1)	Warm (6), Cold (5)	34.73 ± 25.26	4.82 ± 4.51	434	55.56 ± 24.03
GI.3[P21]	1	School (1)	P/P (1)	Cold (1)	18	ND	ND	ND

Table 4. Cont.

Genotype	Total Outbreaks	Setting (Number of Outbreaks)	Mode of Transmission	Season	Mean Age of Cases (Years)	Duration of Outbreak (Days)	Total Number of Affected Individuals	Average Attack Rate (%) <sup>a</sup>
GII.3[P30]	3	School (1), Nursing home (1), Hotel (1)	P/P (2), Foodborne (1)	Cold (2), Warm (1)	51.77 ± 27.94	10.5 ± 0.71 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	42.17 ± 46.43 <sup>b</sup>
GII.4[P4] Sydney 2012	2	Nursing home (2)	P/P (2)	Cold (2)	94.6 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	19.75 <sup>b</sup>
GII.4[P16] Sydney 2012	11	Nursing home (7) Kindergarten/ Preschool (3), Long-term care facility (1)	P/P (11)	Cold (11)	59.38 ± 37.73 <sup>b</sup>	12.37 ± 8.49 <sup>c</sup>	255 <sup>f</sup>	37.52 ± 14.4 <sup>f</sup>
GII.4[P31] Sydney 2012	14	Nursing home (11), Kindergarten/ Preschool (1), Long-term care facility (1), Hotel (1)	P/P (11), Foodborne (3)	Cold (12), Warm (2)	64.02 ± 24.81 <sup>d</sup>	6.89 ± 6.15 <sup>d</sup>	206 <sup>g</sup>	21.24 ± 18.23 <sup>g</sup>
GII.5[P40]	3	Nursing home (1), Youth hostel/ Campground (1), School (1)	Foodborne (2), P/P (1)	Cold (2), Warm (1)	43.15 ± 14.06	4.33 ± 2.31	87	43.36 ± 28
GII.6[P7]	6	Nursing home (2), Youth hostel/ Campground (2), School (1), Hotel (1)	P/P (3), Foodborne (2), Foodborne+P/P (1)	Warm (3), Cold (3)	35.18 ± 22.29	5.33 ± 4.41	153 <sup>b</sup>	51.24 ± 27.93 <sup>b</sup>
GII.8[P8]	1	Youth hostel/ Campground (1)	Foodborne (1)	Warm (1)	15.6	ND	20	20.41
GII.10[P16]	1	Socio-health centre (1)	P/P (1)	Warm (1)	62	10	32	17.58
GII.14[P7]	1	School (1)	P/P (1)	Warm (1)	18.69	ND	11	42.31
GII.17[P17]	9	Nursing home (6), Youth hostel/ Campground (1), School (1) Long-term care facility (1)	P/P (7), Foodborne (2)	Cold (8), Warm (1)	58.89 ± 24.75	6.29 ± 3.55 <sup>e</sup>	466	32.06 ± 20.8

Table 4. Cont.

Genotype	Total Outbreaks	Setting (Number of Outbreaks)	Mode of Transmission	Season	Mean Age of Cases (Years)	Duration of Outbreak (Days)	Total Number of Affected Individuals	Average Attack Rate (%) <sup>a</sup>
Multiple GII genotypes <sup>l</sup>	1	School (1)	P/P (1)	Cold (1)	18.82	12	55	11.58
Total GII	65	Nursing home (33), Youth hostel/ Campground (11), School (9), Kindergarten/ Preschool (4), Hotel (4), Long-term care facility (3), Hospital (1)	P/P (47), Foodborne (14), Foodborne + P/P (3), Waterborne (1)	Cold (48), Warm (17)	48 ± 31.05 <sup>h</sup>	7.56 ± 6.22 <sup>i</sup>	1905 <sup>j</sup>	37.23 ± 23.4 <sup>j</sup>
		Multiple GI + GII genotypes <sup>m</sup>	3	Nursing home (2), Kindergarten/ Preschool (1)	P/P (2), Foodborne (1)	Cold (3)	49.46 ± 37.1	7 ± 5.66 <sup>b</sup>
Total	93	Nursing home (45), Youth hostel/ Campground (19), School (12), Kindergarten/ Preschool (5), Hotel (6), Long-term care facility (5), Hospital (1)	P/P (68), Foodborne (21), Foodborne + P/P (3), Waterborne (1)	Cold (64), Warm (29)	46.31 ± 30.03	7.59 ± 6.12	2677	34.22 ± 23.14

P/P person to person. ND: not determined. <sup>a</sup> Results are expressed as the mean ± the standard deviation. <sup>b</sup> Missing information for 1 outbreak. <sup>c</sup> Missing information for 3 outbreaks. <sup>d</sup> Missing information for 5 outbreaks. <sup>e</sup> Missing information for 2 outbreaks. <sup>f</sup> Missing information for 4 outbreaks. <sup>g</sup> Missing information for 6 outbreaks. <sup>h</sup> Missing information for 7 outbreaks. <sup>i</sup> Missing information for 12 outbreaks. <sup>j</sup> Missing information for 13 outbreaks. <sup>k</sup> GI.3[P13]/GI.2[Puntyped]. <sup>l</sup> GI.2[P16]/GI.3[P30]. <sup>m</sup> GI.4[P16]/Sydney 2012/GI.4[P4], GI.17[P17]/GI.3[P13] and GI.4[P4] Sydney 2012/GI.6[P11].

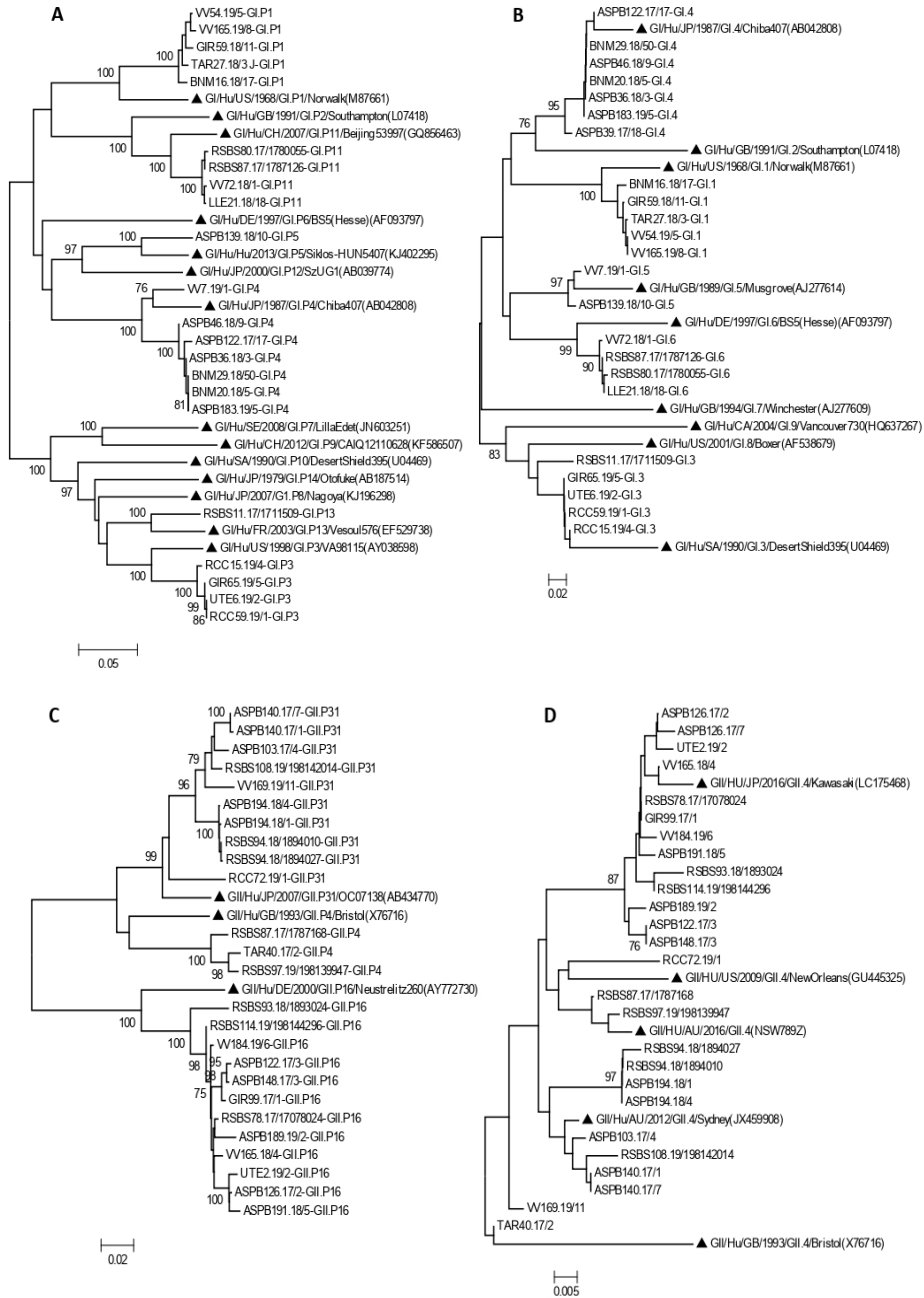
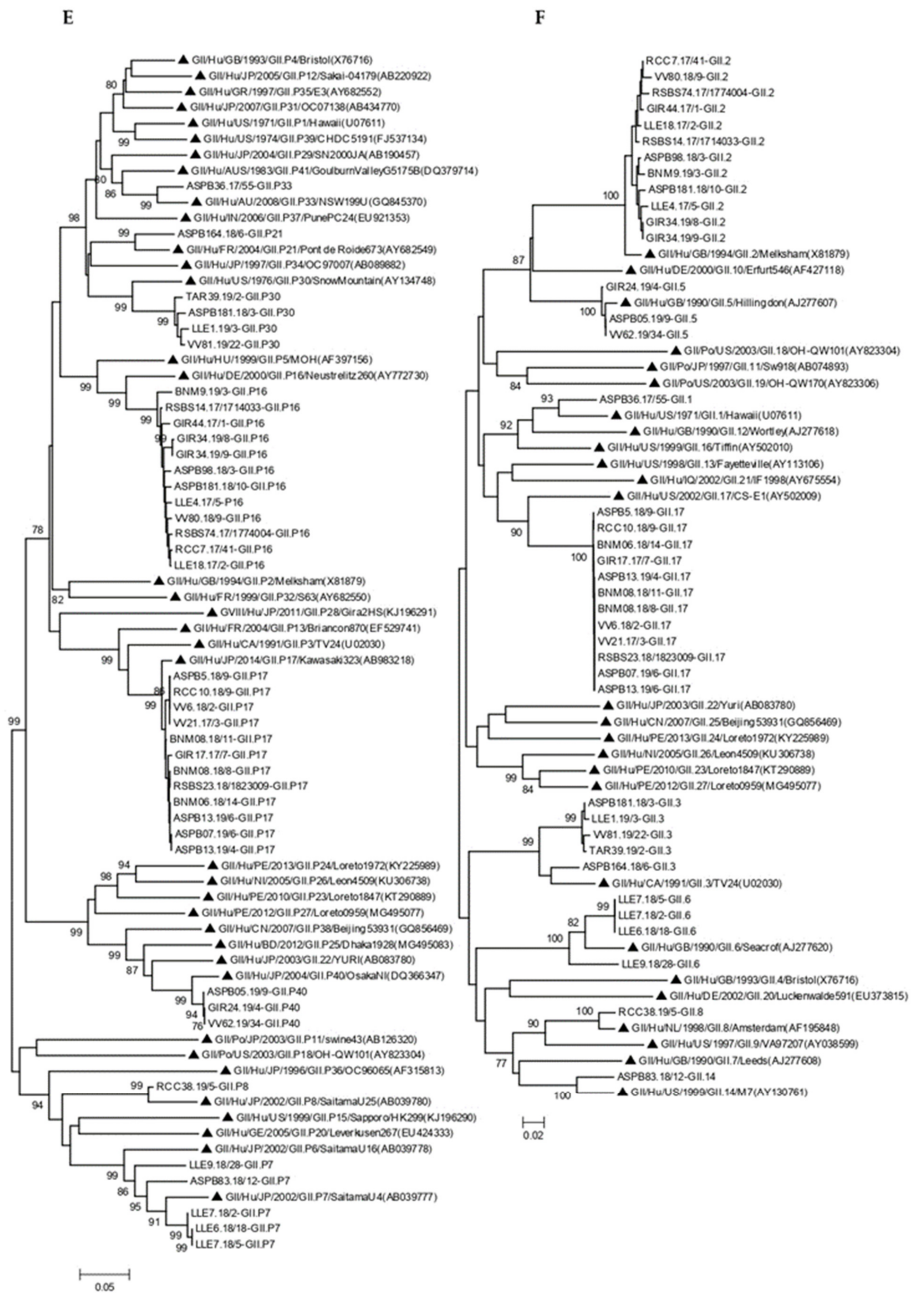


Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Phylogenetic analysis of HuNoV strains isolated in outbreaks of gastroenteritis, based on RdRp (A,C,E) and VP1 regions (B,D,F). Panels A and B include all GI genotypes, panel C and D include all GII genotypes except GII.4, and panels E and F include all GII.4 variants. Bootstrap values above 75 are shown in the figure. Trees are drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Symbol 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 sample number.



**Table 5.** Location of amino acid changes in RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) sequences. Aminoacid positions refer to the corresponding reference strain in each case.

	1608	1609	1610	1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626
GLP1(QCT04921) VV165.19	E E	R R	Q Q	I I	F F	W W	T T	R R	G G	P S	N N	H H	S S	D D	P P	S S	E E	T T	L L
	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778
GLP11(QJC14597) RSBS87.17	M M	F F	R R	W W	M M	R R	F F	H H	D D	L F	G G	L L	W W	T T	G G	D D	R R	N N	L L
	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647
GILP16 (QCE20812) RSBS74.17	L M	M F	A R	L L	L L	G G	E E	A A	S S	L R	H H	G G	P P	S S	F F	Y Y	S S	K K	I I
	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653
GILP31(QCQ77492) ASPB140.17	I I	V V	S S	T D	D D	I I	K K	L L	D D	P T	E E	K R	L L	T T	A A	K K	L L	K K	E E

Letters in bold indicate aminoacid changes. Proline (P), Serine (S), Leucine (L), Phenylalanine (F), Arginine (R) and Threonine (T).

#### 4. Discussion

A total of 100 HuNoV outbreaks were reported during the three-year study, affecting 2677 individuals. In addition, 70% of outbreaks were caused by GII as the leading genogroup, and GII.4 was present in ~40% of them. When compared to a similar study performed in Catalonia during 2010–2012, which identified GII.4 in a higher proportion of outbreaks (66/103) [28], we observed an overall lower proportion of GII.4 outbreaks (including GII.4[P31], GII.4[P4] and GII.4[P16]), and an increase in diversity of other identified HuNoV genotypes over the time (Table S1). These differences could be due to an emerging trend of genotypes other than GII.4, to a lower persistence in the environment or to an absence of immunity against particular genotypes [32].

Despite this lower abundance, GII.4 genotypes were still predominant during the study period. GII.4[P31] Sydney 2012 was the most predominant genotype in Thailand [33] and China [34] during the same period, and along with GII.4[P16] Sydney 2012 were the most identified genotypes in the study, as happened in Germany in 2018 [16]. After GII.4, GII.2[P16] was identified in more than 10% of the outbreaks. This genotype was also the most frequently isolated genotype from sewage in Valencia, Spain in 2016–2017 [35].

As for RdRp genotypes, GII.P16 was the most frequent genotype, isolated in 25% of outbreaks. We detected it in combination with GII.2, GII.4 and GII.10 capsids, although it can also be combined with GII.1, GII.3, GII.13 and GII.12 [24,36]. Due to containing substitutions that enhance RdRp function and virus transmission [37], it is plausible that GII.P16 combined with the fast evolving GII.4 capsids [38] have resulted in a highly transmissible virus [14,15,19].

We identified GII.17[P17] in all three years, mostly in 2018, without observing an increasing trend. Globally, it has been reported that GII.17[P17] reached a peak in 2014/2015, but its incidence began to decline after that [8,39]. A remarkable proportion of GI.3[P3] outbreaks was observed in 2019, being not previously identified in 2017 or 2018, although it did not represent a significant increase in the number of affected individuals that year, as in other genotypes.

Almost one half of the outbreaks occurred in nursing homes, as elderly residents are a highly vulnerable group to the infection who could also experience more severe symptoms. A longer illness duration and extended episodes of excretion have been associated with aged patients, increasing the probability of transmission [40–42]. Nevertheless, in our report, a longer duration of outbreaks was significantly associated with kindergarten/preschool setting. Young children are more likely to infect other people possibly because they have wider spheres of activity, lower levels of hygiene and a higher susceptibility to agents due to insufficient acquired immunity [43,44].

Among transmission modes, P/P was identified in 74% of outbreaks as the most common route to acquire HuNoV infection [8,45] followed by foodborne in 24% of them, similar to what has been observed elsewhere [20,46,47]. However, a significantly higher attack rate was observed in foodborne outbreaks, since this mode of transmission is capable

of occurring in larger outbreaks affecting a major number of individuals rather than P/P transmission, probably by the ingestion of higher infectious doses and the easier identification of individuals exposed to the contaminated source [48,49]. Thus, youth hostel/campgrounds had a significant higher average attack rate over nursing homes because of its mostly identified foodborne transmission origin. Apart from particular food contamination, poor hygienic practices during food preparation can be related to food contamination and the source of foodborne transmission, which could result in a faster virus expansion to consumers [50].

Considered jointly, GII.6[P7] and GII.2[P16] had a higher average attack rate as compared to GII.4[P31] Sydney 2012, probably due to lack of immunity against these less frequent genotypes. In addition, these genotypes were mostly identified in foodborne outbreaks occurring in youth hostel/campgrounds, while GII.4[P31] Sydney 2012 outbreaks occurred predominantly in nursing homes with P/P transmission. An association between GII, particularly GII.4, to P/P transmission and to nursing homes/older patients during cold months has also been reported by previous studies [9,28,51,52]. In our study, ~75% of all three GII.4 Sydney 2012 outbreaks occurred in nursing homes, >85% of the outbreaks occurring during the cold season peak, and ~90% of them were interpersonal outbreaks. Alternatively, in other settings, GI and non-GII.4 are more frequent [53]. In the study, we did observe a significant association of GII.2[P16] and GI.3[P3] with outbreaks occurring in youth hostels or campgrounds and affecting children and young adults. Finally, 68% of the HuNoV outbreaks were reported during cold months (October–March), as people are more frequently clustered indoors, which enhances P/P transmission, and a marked seasonality was especially observed for GII outbreaks only. A lower seasonality observed for GI has also been reported by Matthews et al. [49].

A study of amino acid sequences of partial ORF1 and ORF2 among all typed sequences has been performed to describe novel substitutions. Four amino acid changes have been described in GI.P1, GI.P11, GII.P16 and GII.P31 RdRp sequences compared to those uploaded to GenBank. Point mutations in non-structural proteins could lead to novel properties with better fitness potential in different norovirus genotypes [54].

## 5. Conclusions

Overall, this study shows a great diversity of HuNoV detected as cause of gastroenteritis outbreaks during the three-year period, with 21 different genotypes circulating in the community. Only genotypes GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4 [P16], GII.4 [P31] and GII.17[P17] were consistently detected every year, and, of them, only GII.2[P16] showed a reduction in prevalence over time. While a GII.4 Sydney genotype was frequently isolated in outbreaks occurring at nursing homes, outbreaks caused by GII.2[P16] and GI.3[P3] occurred more frequently in youth hostels or campgrounds. Seasonality was strongly observed for GII outbreaks only. Surveillance of HuNoV strains circulating in the community is important for a better understanding of factors driving virus evolution and to provide information for vaccine development.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14030488/s1>, Table S1: Prevalence of genotypes identified during the study period per year.

**Author Contributions:** Conceptualization, À.D., N.T. and S.G.; methodology, E.A.-E., E.R., T.C.S. and N.S., C.F.; formal analysis, S.S. and R.B.; investigation, E.A.-E.; data curation, E.A.-E., E.R., T.C.S., C.I. and L.C.; writing—original draft preparation, E.A.-E.; writing—review and editing, S.G., À.D., R.M.P. and A.B.; supervision, S.G.; funding acquisition, À.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/02005 (Co-funded by European Regional Development Fund “Investing in your future”) and the Catalan Agency for the Management of Grants for University (AGAUR Grant Number 2017/SGR 1342).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00006099, April 2016). This project involved a retrospective analysis of previously collected aggregate outbreak data as routine surveillance activity. No personal identifying information was analysed in this work.

**Informed Consent Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099). The authors declare that the Bioethics Committee of University of Barcelona approved the waiver for informed consent. All data used in the analysis were collected during routine public health surveillance activities as part of the legislated mandate of the Health Department of Catalonia, which is officially authorized to receive, treat and temporarily store personal data in the case of infectious disease. All data were fully anonymized.

**Data Availability Statement:** Identified sequences were submitted to GenBank (accession No. OM182806-OM182828 for GI, OM185329-OM185367 for GII and OM185492-OM185517 for GII.4).

**Acknowledgments:** 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 Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005) is composed by: Miquel Alsedà, Josep Àlvarez, Irene Barrabeig, Anna Isabel Belver, Neus Camps, Sofia Minguell, Monica Carol, Pere Godoy, Conchita Izquierdo, Mireia Jané, Ana Martínez, Ignacio Parrón, Cristina Pérez, Ariadna Rovira, Maria Sabaté, Maria Rosa Sala, Núria Torner, Rosa Maria Vileu (Agència de Salut Pública de Catalunya; CIBERESP); Anna de Andrés, Javier de Benito, Esteve Campubí, Montse Cunillé, M Lluisa Fornas, Antonio Moreno-Martínez, Efrén Razquin, Cristina Rius, Sara Sabaté, Mercé de Simón (Agència Salut Pública de Barcelona; CIBERESP); Rosa Bartolomé, Thais Cornejo (Hospital Vall d'Hebron); Susana Guix (Laboratori de Virus Entèrics, Universitat de Barcelona); Lorena Coronas, Àngela Domínguez, Núria Soldevila (Departament de Medicina, Universitat de Barcelona; CIBERESP).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Ahmed, S.; Hall, A.; Robinson, A.; Verhoef, L.; Premkumar, P.; Parashar, U. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 725–730. [[CrossRef](#)]
2. Glass, R.I.; Parashar, U.D.; Estes, M.K. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1776–1785. [[CrossRef](#)]
3. Bányai, K.; Estes, M.K.; Martella, V.; Parashar, U.D. Viral gastroenteritis. *Lancet* **2018**, *392*, 175–186. [[CrossRef](#)]
4. Rushton, S.P.; Sanderson, R.A.; Reid, W.D.K.; Shirley, M.D.F.; Harris, J.P.; Hunter, P.R.; O'Brien, S.J. Transmission routes of rare seasonal diseases: The case of norovirus infections. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2019**, *374*, 20180267. [[CrossRef](#)]
5. Jiang, X.; Wang, M.; Wang, K.; Estes, M.K. Sequence and genomic organization of norwalk virus. *Virology* **1993**, *195*, 51–61. [[CrossRef](#)]
6. Thorne, L.G.; Goodfellow, I.G. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 278–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. White, P.A. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 741–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Van Beek, J.; de Graaf, M.; Al-Hello, H.; Allen, D.J.; Ambert-Balay, K.; Bötteldoom, N.; Brytting, M.; Buesa, J.; Cabrerizo, M.; Chan, M.C.-W.; et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005–2016: An epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 545–553. [[CrossRef](#)]
9. Vega, E.; Barclay, L.; Gregoricus, N.; Shirley, S.H.; Lee, D.; Vinjé, J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 147–155. [[CrossRef](#)]
10. Chhabra, P.; de Graaf, M.; Parra, G.I.; Chan, M.C.W.; Green, K.; Martella, V.; Wang, Q.; White, P.A.; Katayama, K.; Vennema, H.; et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1393–1406. [[CrossRef](#)]
11. De Graaf, M.; van Beek, J.; Vennema, H.; Podkolzin, A.T.; Hewitt, J.; Bucarado, F.; Templeton, K.; Mans, J.; Nordgren, J.; Reuter, G.; et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus—End of the GII.4 era? *Eurosurveillance* **2018**, *20*, 21178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lindesmith, L.C.; Brewer-Jensen, P.D.; Mallory, M.L.; Debbink, K.; Swann, E.W.; Vinjé, J.; Baric, R.S. 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*, 1145–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hernandez, J.M.; Silva, L.D.; Sousa, E.C., Jr.; Cardoso, J.F.; Reymão, T.K.A.; Portela, A.C.R.; de Lima, C.P.S.; Teixeira, D.M.; Lucena, M.S.S.; Nunes, M.R.T.; et al. Evolutionary and molecular analysis of complete genome sequences of Norovirus from Brazil: Emerging recombinant strain GII.P16/GII.4. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Hasing, M.E.; Lee, B.E.; Qiu, Y.; Xia, M.; Pabbaraju, K.; Wong, A.; Tipples, G.; Jiang, X.; Pang, X.L. Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012–2018. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lun, J.H.; Hewitt, J.; Yan, G.J.H.; Tuipulotu, D.E.; Rawlinson, W.D.; White, P.A. Recombinant GII.P16/GII.4 sydney 2012 was the dominant norovirus identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses* **2018**, *10*, 548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Niendorf, S.; Faber, M.; Tröger, A.; Hackler, J.; Jacobsen, S. Diversity of noroviruses throughout outbreaks in Germany 2018. *Viruses* **2020**, *12*, 1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Thanusuwanasak, T.; Puenpa, J.; Chuchaona, W.; Vongpunsawad, S.; Poovorawan, Y. Emergence of multiple norovirus strains in Thailand, 2015–2017. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *61*, 108–112. [[CrossRef](#)]
18. Liu, L.T.; Kuo, T.; Wu, C.; Liao, W.; Hall, A.J.; Wu, F. Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus, Taiwan, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 23–26. [[CrossRef](#)]
19. Niendorf, S.; Jacobsen, S.; Faber, M.; Eis-hübinger, A.M.; Hofmann, J.; Zimmermann, O.; Höhne, M.; Bock, C. Niendorf 2016 steep rise in norovirus cases and emergence of a new GII.P16\_GII.2. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30447. [[CrossRef](#)]
20. Jin, M.; Wu, S.; Kong, X.; Xie, H.; Fu, J.; He, Y.; Feng, W.; Liu, N.; Li, J.; Rainey, J.J.; et al. Norovirus outbreak surveillance, China, 2016–2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 437–445. [[CrossRef](#)]
21. Lu, J.; Sun, L.; Fang, L.; Yang, F.; Mo, Y.; Lao, J.; Zheng, H.; Tan, X.; Lin, H.; Rutherford, S.; et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1240–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chan, M.C.W.; Hu, Y.; Chen, H.; Podkolzin, A.T.; Zaytseva, E.V.; Komano, J.; Sakon, N.; Poovorawan, Y.; Vongpunsawad, S.; Thanusuwanasak, T.; et al. Global spread of norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1354–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. 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. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cannon, J.L.; Barclay, L.; Collins, N.R.; Wikswo, M.E.; Castro, C.J.; Magaña, C.; Gregoricus, N.; Marine, R.; Chhabra, P.; Vinjé, J. Genetic and epidemiologic trends of Norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2208–2221. [[CrossRef](#)]
25. Kroneman, A.; Vega, E.; Vennema, H.; Vinjé, J.; White, P.A.; Hansman, G.; Green, K.; Martella, V.; Katayama, K.; Koopmans, M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2059–2068. [[CrossRef](#)]
26. Robilotti, E.; Deresinski, S.; Pinsky, B.A. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 134–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Barclay, L.; Park, G.; Vega, E.; Hall, A.; Parashar, U.; Vinjé, J.; Lopman, B. Infection control for norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 731–740. [[CrossRef](#)]
28. Sabrià, A.; Pintó, R.M.; Bosch, A.; Bartolomé, R.; Cornejo, T.; Torner, N.; Martínez, A.; De Simón, M.; Domínguez, A.; Guix, S. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J. Clin. Virol.* **2014**, *60*, 96–104. [[CrossRef](#)]
29. *ISO 15216-2:2019; Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 2: Method for Detection.* ISO: Geneva, Switzerland, 2019.
30. Kroneman, A.; Vennema, H.; Deforche, K.; Avoort, H.; Peñaranda, S.; Oberste, M.S.; Vinje, J.; Koopmans, M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* **2011**, *51*, 121–125. [[CrossRef](#)]
31. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
32. Gallimore, C.I.; Iturriza-Gomara, M.; Xerry, J.; Adigwe, J.; Gray, J.J. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 1295–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chuchaona, W.; Chansaenroj, J.; Wanlapakorn, N.; Poovorawan, Y. Recombinant GII.Pe-GII.4 Norovirus, Thailand, 2017–2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 2017–2018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kuang, X.; Teng, Z.; Zhang, X. Genotypic prevalence of norovirus GII in gastroenteritis outpatients in Shanghai from 2016 to 2018. *Gut Pathog.* **2019**, *11*, 40. [[CrossRef](#)]
35. Santiso-Bellón, C.; Randazzo, W.; Pérez-Cataluña, A.; Vila-Vicent, S.; Gozalbo-Rovira, R.; Muñoz, C.; Buesa, J.; Sanchez, G.; Díaz, J.R. Epidemiological surveillance of norovirus and rotavirus in sewage (2016–2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms* **2020**, *8*, 458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Barclay, L.; Cannon, J.L.; Wikswo, M.E.; Phillips, A.R.; Browne, H.; Montmayeur, A.M.; Tatusov, R.L.; Burke, R.M.; Hall, A.J.; Vinjé, J. Emerging novel GII.P16 noroviruses associated with multiple capsid genotypes. *Viruses* **2019**, *11*, 535. [[CrossRef](#)]
37. Ruis, C.; Roy, S.; Brown, J.R.; Allen, D.J.; Goldstein, R.A.; Breuer, J. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Parra, G.I.; Squires, R.B.; Karangwa, C.K.; Johnson, J.A.; Lepore, C.J.; Sosnovtsev, S.V.; Green, K.Y. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006136. [[CrossRef](#)]
39. Xue, L.; Cai, W.; Gao, J.; Zhang, L.; Dong, R.; Li, Y.; Wu, H.; Chen, M.; Zhang, J.; Wang, J.; et al. The resurgence of the norovirus GII.4 variant associated with sporadic gastroenteritis in the post-GII.17 period in South China, 2015 to 2017. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 696. [[CrossRef](#)]
40. 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*, 42–46. [[CrossRef](#)]

41. Kroneman, A.; Verhoef, L.; Harris, J.; Vennema, H.; Duizer, E.; van Duynhoven, Y.; Gray, J.; Iturriza, M.; Böttiger, B.; Falkenhorst, G.; et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2959–2965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rajagopalan, S.; Yoshikawa, T.T. Norovirus infections in long-term care facilities. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2016**, *64*, 1097–1103. [[CrossRef](#)]
43. Mossong, J.; Hens, N.; Jit, M.; Beutels, P.; Auranen, K.; Mikolajczyk, R.; Massari, M.; Salmaso, S.; Tomba, G.S.; Wallinga, J.; et al. Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med.* **2008**, *5*, e74. [[CrossRef](#)]
44. Kumazaki, M.; Usuku, S. Norovirus genotype distribution in outbreaks of acute gastroenteritis among children and older people: An 8-year study. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Phillips, G.; Tam, C.C.; Rodrigues, L.C.; Lopman, B. Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol. Infect.* **2011**, *139*, 1676–1686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Calderwood, L.E.; Wikswo, M.E.; Mattison, C.P.; Kambhampati, A.K.; Balachandran, N.; Vinjé, J.; Barclay, L.; Hall, A.J.; Parashar, U.; A Mirza, S. Norovirus outbreaks in long-term care facilities in the United States, 2009–2018: A decade of surveillance. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Barret, A.S.; Silva, N.J.D.; Ambert-Balay, K.; Delmas, G.; Bone, A.; Thiolet, J.M.; Vaillant, V. Surveillance for outbreaks of gastroenteritis in elderly long-term care facilities in France, November 2010 to May 2012. *Eurosurveillance* **2015**, *19*, 20859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Noda, M.; Fukuda, S.; Nishio, O. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 216–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Matthews, J.; Dickey, B.; Miller, R.; Felzer, J.; Dawson, B.; See, A.; Rocks, J.J.; Kiel, J.; Montes, J.S.; Moe, C.L.; et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: A systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bosch, A.; Gkogka, E.; Le Guyader, F.S.; Loisy-Hamon, F.; Lee, A.; van Lieshout, L.; Marthi, B.; Myrmel, M.; Sansom, A.; Schultz, A.C.; et al. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *285*, 110–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bon, F.; Ambert-Balay, K.; Giraudon, H.; Kaplon, J.; Le Guyader, S.; Pommepuy, M.; Gallay, A.; Vaillant, V.; de Valk, H.; Chikhi-Brachet, R.; et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 4659–4664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lopman, B.A.; Adak, G.K.; Reacher, M.H.; Brown, D.W.G. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992–2000. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. de Graaf, M.; Villabruna, N.; Koopmans, M.P. Capturing norovirus transmission. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *22*, 64–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tohma, K.; Lepore, C.J.; Ford-Siltz, L.A.; Parra, G.I. Phylogenetic analyses suggest that factors other than the capsid protein play a role in the epidemic potential of GII.2 Norovirus. *MSphere* **2017**, *2*, e00187-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# ARTICLE II



## **Article II:** Detection of norovirus in saliva samples from acute gastroenteritis cases and asymptomatic subjects: association with age and higher shedding in stool

Anfruns-Estrada E, Sabrià A, Fuentes C, Sabaté S, Razquin E, Cornejo T, Bartolomé R, Torner N, Izquierdo C, Soldevila N, Coronas L, Dominguez A, Pintó RM, Bosch A, Guix S, and The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia (PI16/02005).

Viruses. 2020;12(12):1369. doi: 10.3390/v12121369.

Les infeccions pels dos genogrups majoritaris de HuNoV (GI i GII) són la causa principal dels brots de GEA a tot el món i en tots els grups d'edat. Tanmateix, s'han descrit diferències individuals en la susceptibilitat a la infecció per diversos genotips de HuNoV. Aquesta discriminació rau en part en funció de l'expressió d'HBGA, la qual està determinada principalment pel gen *FUT2*. Així, els individus que no presenten una expressió funcional d'aquest gen poden romandre parcialment protegits contra les infeccions de HuNoV.

Per altra banda, malgrat que el nombre d'estudis sigui molt escàs, l'RNA de HuNoV també ha estat detectat per la RTqPCR a la saliva i a la cavitat oral d'individus infectats amb gastroenteritis, fins i tot entre els que no havien presentat vòmits.

Els objectius del present estudi són:

- Investigar la presència de HuNoV en mostres de saliva d'individus implicats en brots de GEA, i estudiar la relació de la presència de HuNoV a la saliva amb el genotip del virus, la



simptomatologia, la càrrega viral de HuNoV en femta, l'edat i l'estat de secretor de l'individu.

- Avaluar les mostres de saliva com a alternatives a les de femta pel diagnòstic de la infecció de HuNoV.

Es van analitzar mitjançant la RTqPCR un total de 347 mostres de saliva d'individus afectats en 25 brots. D'aquestes, es va obtenir un resultat positiu en 30 d'elles, totes identificades en subjectes exposats a genotips de GI. L'RNA de HuNoV es va detectar a la saliva d'un 12.1% dels casos estudiats i en un 3.2% dels individus asimptomàtics. Comparant els mètodes de diagnòstic mitjançant la RTqPCR s'estableix que les mostres de femta seguirien essent preferibles pel diagnòstic de les infeccions, obtenint una sensibilitat del 11.5% a partir de mostres de saliva.

L'aparició de nàusees i l'absència de febre es van correlacionar lleugerament amb la positivitat de l'RNA a la saliva, però la resta de símptomes de GEA estudiats, l'estat secretor o el sexe, no van tenir cap associació significativa. Contràriament, l'edat de 65 anys o més es va identificar com un factor de risc significatiu. D'altra banda, els títols virals en femta van ser significativament més alts en el grup amb saliva positiva, confirmant una replicació viral més elevada. Mitjançant assajos de viabilitat amb PMA a la saliva també s'hi documenta la presència de genomes encapsidats dins de càpsides intactes, que potencialment es trobarien en estat infecciosos. El genotipat del *FUT2* per determinar l'estat secretor dels individus també va permetre identificar, per primera vegada en no secretors, el genotip GI.4 com a responsable de la infecció.





El mecanisme darrere de la detecció de HuNoV a la saliva quan l'individu no mostra vòmits és desconegut. Es podria explicar per un reflux de continguts gastrointestinals a la cavitat oral i la conseqüent unió als receptors HBGA que s'expressen a la cavitat oral, sense poder-se

descartar un cert nivell de replicació. Altres motius en podrien ser el genotip del virus en particular i els factors propis de l'hoste, com la presència d'immunoglobulines a la saliva o una composició particular de la microbiota. Tot i que les dades mostren que l'aparició de HuNoV a la saliva pot no ser una troballa habitual en individus infectats, obre la porta a un possible transmissió oral-oral amb concentracions prou altes com per infectar un nou hoste, i contribuir a la propagació de la infecció.



Article

# Detection of Norovirus in Saliva Samples from Acute Gastroenteritis Cases and Asymptomatic Subjects: Association with Age and Higher Shedding in Stool

Eduard Anfruns-Estrada <sup>1,2</sup>, Aurora Sabrià <sup>1,2</sup>, Cristina Fuentes <sup>1,2</sup>, Sara Sabaté <sup>3</sup>, Efrén Razquin <sup>3</sup>, Thais Cornejo <sup>4</sup>, Rosa Bartolomé <sup>4</sup>, Nuria Torner <sup>5,6</sup>, Conchita Izquierdo <sup>5</sup>, Nuria Soldevila <sup>6,7</sup> , Lorena Coronas <sup>6,7</sup>, Angela Dominguez <sup>6,7</sup> , Rosa M. Pintó <sup>1,2</sup>, Albert Bosch <sup>1,2</sup> , Susana Guix <sup>1,2,\*</sup>  and on behalf of the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005) <sup>†</sup>

<sup>1</sup> Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; eanfruns@ub.edu (E.A.-E.); aurorasabria@ub.edu (A.S.); cfuentes@ub.edu (C.F.); rpinto@ub.edu (R.M.P.); abosch@ub.edu (A.B.)

<sup>2</sup> Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), University of Barcelona, 08921 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, 08001 Barcelona, Spain; ssabate@aspb.cat (S.S.); erazquin@aspb.cat (E.R.)

<sup>4</sup> Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; thais.cornejo@vhir.org (T.C.); rbartolome@vhebron.net (R.B.)

<sup>5</sup> Department of Health, Generalitat of Catalonia, 08005 Barcelona, Spain; nuria.torner@gencat.cat (N.T.); conchita.izquierdo@gencat.cat (C.I.)

<sup>6</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; nsoldevila@ub.edu (N.S.); coronas@ub.edu (L.C.); angela.dominguez@ub.edu (A.D.)

<sup>7</sup> Department of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

\* Correspondence: susanaguix@ub.edu; Tel.: +34-934021490

<sup>†</sup> The Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia (PI16/02005) is composed by: Miquel Alsedà, Josep Álvarez, Irene Barrabeig, Anna Isabel Belver, Neus Camps, Sofia Minguell, Monica Carol, Pere Godoy, Conchita Izquierdo, Mireia Jané, Ana Martínez, Ignacio Parrón, Cristina Pérez, Ariadna Rovira, Maria Sabaté, Maria Rosa Sala, Núria Torner, Rosa Maria Vileu (Agència de Salut Pública de Catalunya; CIBERESP); Anna de Andrés, Javier de Benito, Esteve Camprubí, Montse Cunillé, M Lluïsa Fornas, A Moreno-Martínez, Efrén Razquin, Cristina Rius, Sara Sabaté, Mercé de Simón (Agència Salut Pública de Barcelona; CIBERESP); Rosa Bartolomé, Thais Cornejo (Hospital Vall d'Hebron); Susana Guix (Laboratori de Virus Entèrics, Universitat de Barcelona); Lorena Coronas, Àngela Domínguez, Núria Soldevila (Departament de Medicina, Universitat de Barcelona; CIBERESP).

Academic Editor: Kim Y. Green

Received: 11 November 2020; Accepted: 28 November 2020; Published: 30 November 2020



**Abstract:** Norovirus infections are a leading cause of acute gastroenteritis outbreaks worldwide and across all age groups, with two main genogroups (GI and GII) infecting humans. The aim of our study was to investigate the occurrence of norovirus in saliva samples from individuals involved in outbreaks of acute gastroenteritis in closed and semiclosed institutions, and its relationship with the virus strain, virus shedding in stool, the occurrence of symptoms, age, and the secretor status of the individual. Epidemiological and clinical information was gathered from norovirus outbreaks occurring in Catalonia, Spain during 2017–2018, and stool and saliva samples were collected from affected and exposed resident individuals and workers. A total of 347 saliva specimens from 25 outbreaks were analyzed. Further, 84% of individuals also provided a paired stool sample. For GII infections, norovirus was detected in 17.9% of saliva samples from symptomatic cases and 5.2% of asymptomatic individuals. Positivity in saliva occurred in both secretors and nonsecretors. None of the individuals infected by norovirus GI was positive for the virus in saliva. Saliva positivity did not correlate with any of the studied symptoms but did correlate with age  $\geq 65$  years old. Individuals who

were positive in saliva showed higher levels of virus shedding in stool. Mean viral load in positive saliva was  $3.16 \pm 1.08 \log_{10}$  genome copies/mL, and the predominance of encapsidated genomes was confirmed by propidium monoazide (PMA)xx-viability RTqPCR assay. The detection of norovirus in saliva raises the possibility of oral-to-oral norovirus transmission during the symptomatic phase and, although to a lesser extent, even in cases of asymptomatic infections.

**Keywords:** human norovirus; saliva; acute gastroenteritis; PMAxx-viability RTqPCR; asymptomatic infection; FUT2 genotyping

---

## 1. Introduction

Human noroviruses (HuNoV) are associated with 18% of diarrheal diseases worldwide and cause 200,000 deaths among children every year, mostly in developing countries [1,2]. Infections are mainly transmitted through the fecal–oral route, often involving contaminated food and water, although transmission through vomit is also well documented [3–5]. HuNoV are classified into 10 genogroups, with genogroup I (GI) and genogroup II (GII) being the most prevalent affecting humans, with more than 9 and 27 genotypes within GI and GII, respectively [6]. Individual differences in susceptibility to infections by different genotypes have been described depending on the expression of histoblood group antigens (HBGA), the expression of which is primarily determined by the FUT2 gene [7]. Although secretor-negative individuals are resistant to several genotypes, infections in nonsecretors have been documented for GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3, GII.6, GII.7, GII.4, and GII.17 [7–9].

HuNoV RNA has been detected by RTqPCR in saliva and the oral cavity of infected individuals with gastroenteritis, but the number of studies is very scarce. Kirby et al. [10] detected 24% HuNoV RNA positivity in mouthwashes from hospitalized patients with GII.4 gastroenteritis, with a slightly positive association with previous vomiting, especially during the 24 h before specimen collection. They also observed viral RNA positivity in early morning oral samples up to 10–15 days after disease onset in 6 individuals of a GII.3 family outbreak, despite some of them not having vomited. Detection of HuNoV RNA in saliva in the absence of vomiting has also been confirmed in an immunocompromised individual [11]. Finally, a screening of oral swabs from children with acute gastroenteritis identified RNA from diarrheal viruses, including HuNoV, in 16.9% of samples [12].

The main objectives of the current work were to investigate the occurrence of HuNoV in saliva samples from individuals involved in outbreaks of acute gastroenteritis in closed and semiclosed institutions and its relationship with the virus strain, the occurrence of symptoms and virus shedding in stool, and the secretor status of the individual. We also evaluated if saliva samples would be a suitable alternative specimen to stools to diagnose HuNoV infection. Finally, selected saliva specimens were analyzed using a viability RTqPCR assay to avoid detection of noninfectious viral particles and obtain a better assessment of infectivity [13–15].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Definitions and Sample Collection

HuNoV infection, acute gastroenteritis, and confirmed cases of HuNoV acute gastroenteritis were defined as previously described [16]. Epidemiological and clinical information was gathered from 25 HuNoV outbreaks occurring in closed and semiclosed institutions (nursing homes, socio-health centers, kindergartens, preschool centers, and others) in Catalonia, Spain during 2017–2018. Saliva specimens were collected from 347 subjects, including affected and exposed residents ( $n = 194$ ) and workers ( $n = 148$ ) (information could not be obtained for 5 subjects). Two hundred and ninety-two individuals (84%) provided paired stool and saliva samples, and 55 individuals (16%) only provided saliva. Further, 159 individuals also provided a stool specimen as part of the routine outbreak

investigation. Finally, individuals were asked to provide 1–2 serial additional saliva and/or stool samples collected at approximately 10-day intervals; 38 subjects provided 1 additional paired stool and saliva, 84 individuals provided only serial stool samples, and 50 of them provided a second serial stool sample. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099).

Saliva specimens were collected by asking the individuals to spit 2–3 mL of saliva directly into a sterile polypropylene test tube, preferably in the morning, before eating and before brushing teeth. For symptomatic individuals, mean time between onset of symptoms and first sample collection was  $4 \pm 3.4$  days (0–20 days). All specimens were transported to the laboratory at 4 °C and further stored at –20 °C until testing.

## 2.2. HuNoV Testing

Presence of HuNoV in stool was assessed by real-time RTqPCR at the Hospital Universitari Vall d’Hebron and the Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB), as previously described [16]. Viral RNA was extracted from a 10% stool suspension using the NucliSENS® easyMAG® system (BioMérieux, Marcy-L’Etoile, France), and the presence of HuNoV was assessed by real-time RT-PCR according to ISO 15216-2:2019 [17]. Saliva samples were screened for HuNoV by RTqPCR at the Enteric Virus Laboratory (University of Barcelona). Viral RNA was extracted from 0.2–0.5 mL of saliva, and viral RNA was quantified according to the ISO 15216-1:2017 method [18]. Limit of quantification (LOQ) of viral RNA in saliva was determined at 3.23 and 2.95 log<sub>10</sub> genome copies/mL for GI and GII, respectively.

## 2.3. Secretor Status Genotyping

Genotyping for FUT2 gene was performed by PCR amplification of nucleic acid extracted from saliva using primers described by Marionneau et al. [19], followed by Sanger sequencing. Analysis of the chromatogram peaks was used to determine homozygosity or heterozygosity for G428A mutation.

## 2.4. HuNoV Genotyping

Positive specimens were genotyped for polymerase and capsid genes by seminested RT-PCR [20]. RT-PCR products were purified and sequenced on an ABI Prism 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems). Genotypes were assigned using the Norovirus Genotyping Tool [21].

## 2.5. HuNoV PMAxx-Viability RTqPCR

A propidium monoazide (PMA) viability RTqPCR assay was performed as previously described [22], with minor modifications. Briefly, saliva samples were incubated with 50 µM PMAxx (Biotinum) and 0.5% Triton X-100 in the dark at room temperature (RT) for 10 min at 150 rpm and exposed to light for 15 min using a photoactivation system (Led-Active Blue, Geniul). Nucleic acid extraction was performed using the NucliSens® miniMAG magnetic kit (BioMérieux) according to the manufacturer’s instructions, and viral genomes were quantified according to the ISO 15216-1:2017 method [18]. An aliquot of saliva which had not been treated with PMAxx was extracted simultaneously.

## 2.6. Statistical Analysis

Chi-square tests were used to compare categorical variables and Student’s *t* test was used to compare continuous variables, using Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health [23]. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Epidemiological Features of Studied Outbreaks

The main epidemiological features of 25 studied outbreaks are summarized in Table 1. Most outbreaks (84%) were person-to-person transmitted. Nine outbreaks were caused by GI strains, 14 by GII strains, and 2 outbreaks were caused by mixed genotypes belonging to GI and GII. Stool and/or saliva specimens, together with epidemiological data, were analyzed from 506 individuals, including 304 users attending the affected institution and 197 exposed workers, of which 78.0% and 36.0%, respectively, developed acute gastroenteritis symptoms and were considered as cases (Table 2). Detection of HuNoV in stool by RTqPCR was used to determine HuNoV infection status. HuNoV RNA was detected in 75.4% of stool specimens from symptomatic cases and 19.2% of asymptomatic exposed subjects, confirming the occurrence of asymptomatic infections. The percentage of symptomatic cases which were confirmed by detection of HuNoV in stool by RTqPCR was significantly higher in outbreaks associated with GII strains than GI strains (79.4% vs. 61.4%,  $p = 0.002$ ).

**Table 1.** Main epidemiological features of the 25 outbreaks used in the study.

Feature	Description <sup>a</sup>
Type of transmission	Person-to-person (21); Foodborne (3); Waterborne (1)
Setting	Nursing homes (12); Youth hostels/Campgrounds (4); Socio-health centers (3); Kindergartens/Preschool centers (3); Schools (2); Hotel (1)
Human norovirus (HuNoV) genotype(s)	GII.17[P17] (5); GI.4[P4] (4); GII.4[P31] (3); GII.4[P16] (2); GI.1[P1] (2); GII.2[P16] (3); GI.6[P11] (2); GII.1[P33] (1); mixed GI.3[P13] + GI.2 (1); mixed GI.4[P4] + GII.4[P16] (1); mixed GI.3[P13] + GII.17[P17] (1)
Duration of outbreak in days: range [median] <sup>b</sup>	1–25 [9]
Number of affected individuals: range [median]	7–87 [24]
Attack rate (%): average ± standard deviation <sup>c</sup>	32 ± 20
Days passed between the onset of the outbreak and date of sampling: range [median] <sup>c</sup>	0–17 [5]

<sup>a</sup> Numbers in parentheses indicate the number of outbreaks; numbers in brackets indicate median values.

<sup>b</sup> Information was available for 22 outbreaks. <sup>c</sup> Information was available for 24 outbreaks.

**Table 2.** Subjects included in the study.

Link with the Institution	Symptom Status			Total
	Cases	No Cases	No Data	
Users (residents, students, etc.)	237	67	0	304
Workers	71	125	1	197
No Data	2	3	0	5
Total	310	195	1	506

Secretor status was determined from 346 subjects by FUT2 genotyping, with an overall prevalence of secretors of 82.4%. While most HuNoV infections occurred among secretors, infection could also be confirmed by detection of viral shedding in stool for 18 nonsecretor individuals, related to outbreaks caused by GI.4[P4] ( $n = 6$ ), GI.6[P11] ( $n = 3$ ), GII.1[P33] ( $n = 2$ ), GII.2[P16] ( $n = 2$ ), GII.4[P31] ( $n = 1$ ), GII.17[P17] ( $n = 3$ ), and GI.3[P13] + GI.2 ( $n = 1$ ). All infected nonsecretors, with the exception of an 88-year-old resident from a GII.17[P17] outbreak who did not report symptoms, met the clinical definition of acute gastroenteritis. The viral sequence from the stool of nonsecretor patients was confirmed in subjects infected by GI.4[P4] ( $n = 3$ ), GI.6[P11] ( $n = 3$ ), GII.2[P16] ( $n = 1$ ), and GII.4[P31] ( $n = 1$ ). Our data confirm that natural clinical infections by these genotypes may occur in nonsecretors. As compared with the overall percentage of nonsecretors among all infected subjects (12.2%), the

percentage of nonsecretors among subjects infected by GI.4[P4] and GI.6[P11] was markedly higher, and for subjects infected by GII.4[P16] or GII.4[P33] and GII.17[P17], it was markedly lower (Figure 1), suggesting that the ability of GI.4[P4] and GI.6[P11] viruses to infect both secretors and nonsecretors is similar.

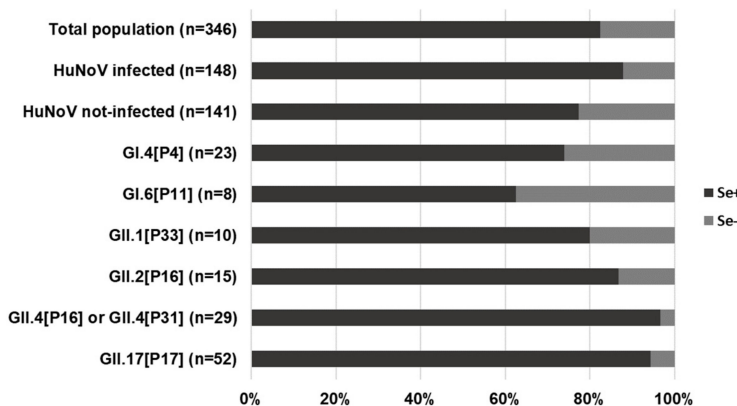


Figure 1. Distribution of secretor and nonsecretor subjects in different subgroups of studied individuals.

### 3.2. Occurrence of HuNoV RNA in Saliva Samples

A total of 347 saliva samples were analyzed by RTqPCR. HuNoV RNA prevalence in saliva was significantly higher in symptomatic cases as compared with asymptomatic exposed subjects (12.1% vs. 3.6%;  $p = 0.001$ ). Information regarding time from sample collection and onset of symptoms was available for 135 samples (123 saliva negative and 12 saliva positive). No significant differences were observed between time from sample collection and onset of symptoms between saliva-positive and saliva-negative groups ( $3.33 \pm 2.39$  vs.  $4.11 \pm 3.48$  days, respectively;  $p = 0.135$ ). Figure 2 shows individual HuNoV RNA titers according to days of sample collection. Of note, all positive saliva samples were only identified in subjects exposed to GII strains; saliva samples from outbreaks caused by GI genotypes were all negative (Table 3). When considering subjects associated with GII outbreaks only, HuNoV RNA was detected in 17.9% of symptomatic cases and in 5.2% of asymptomatic exposed subjects ( $p = 0.003$ ). When comparing RTqPCR diagnosis in saliva to RTqPCR in stool as a reference method, stool samples remain preferable specimens for the diagnosis of HuNoV infections (sensitivity 11.5%, specificity 95.1%).

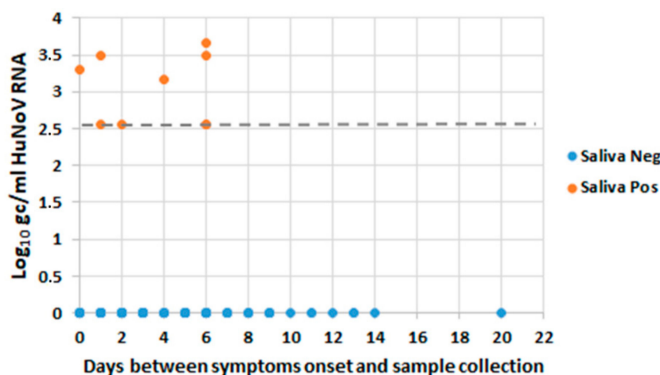


Figure 2. Individual HuNoV RNA titers according to time of sample collection for saliva-positive and saliva-negative subjects. Viral titers are expressed as log<sub>10</sub> genome copies/mL of saliva. Dashed line indicates limit of quantification (LOQ) of viral RNA in saliva.



Of the 30 subjects who were positive in saliva, 83.3% reported to have symptoms. A paired stool sample was available for 23 of them. Of those, 17 were positive in both saliva and stool (73.9%), and 6 were only positive in saliva (26.1%). Only a resident and a worker from an outbreak occurring at a nursing home had detectable HuNoV RNA in saliva despite having a negative stool specimen and not reporting symptoms.

Mean HuNoV GII viral load in positive saliva samples was  $3.16 \pm 1.08 \log_{10}$  genome copies/mL (this value was calculated taking into account that 60% of positive samples fell below the LOQ of the assay). Mean percentage for mengovirus recovery was  $62.5 \pm 36.5$ , and mean percentage of RTqPCR efficiency was  $86.8 \pm 20.0$  and  $80.2 \pm 19.5$  for GI and GII, respectively. No significant differences were observed in saliva viral load according to occurrence of symptoms or genotype. No association was observed between the days passed between sample collection and onset of symptoms. Due to the low viral concentration present in saliva, sequence agreement between viruses isolated in stool and saliva was attempted for three of the saliva samples with higher titers but could only be confirmed for two of them.

Examination of serial stool samples collected for subjects with HuNoV shedding in stool on the first specimen revealed that 71.1% of them (37 out of 52 individuals) remained positive after  $11 \pm 6.4$  days from the first sample, and that 22.2% of the analyzed third specimens collected after  $11 \pm 3.4$  days from the second sample (6 out of 27) still remained positive. In saliva, however, all 38 samples collected at  $10 \pm 5.2$  days from the first sample were negative.

### 3.3. Analysis of Factors Associated with HuNoV RNA Saliva Positivity

Since occurrence of vomiting, especially during the 24 h before specimen collection, has been suggested to be associated with the occurrence of HuNoV RNA in saliva [10], we tested if this association was present, as well as with other clinical symptoms and host factors such as secretor status or age. Since we had not observed any positive saliva sample among subjects involved in GI outbreaks, we excluded data from GI outbreaks from this analysis (Table 4). Our data did not show vomiting as a significant risk factor for HuNoV positivity in saliva. Prevalence of HuNoV in saliva did not correlate with any other clinical symptom or with previous consumption of proton pump inhibitors, secretor status, or sex. Occurrence of nausea and absence of fever did slightly correlate with HuNoV RNA positivity in saliva, but differences were not statistically significant. On the contrary, age  $\geq 65$  years old was identified as a significant risk factor ( $p = 0.022$ ). Analyses performed in all cases, including the ones involved in GI outbreaks, confirmed the same results (data not shown). Regarding the total duration of symptoms, no significant differences were observed between saliva-positive and saliva-negative cases ( $2.6 \pm 1.8$  vs.  $2.8 \pm 1.4$  days, respectively;  $p = 0.118$ ).

**Table 3.** Prevalence of HsuNoV RNA in saliva samples of studied subjects, according to the genotype to which they were exposed.

Genotype	No. of Outbreaks	Symptomatic Cases			Asymptomatic Exposed Subjects			Total	
		No. of Analyzed Samples	No. of Positive Samples (%)	No. of Positive Samples (%)	No. of Analyzed Samples	No. of Positive Samples (%)	No. of Analyzed Samples	No. of Positive Samples (%)	
GI.1[P1]	2	25	0 (0%)	15	0 (0%)	40	0 (0%)		
GI.3[P13]	1	10	0 (0%)	10	0 (0%)	20	0 (0%)		
GI.4[P4]	4	25	0 (0%)	20	0 (0%)	45	0 (0%)		
GI.6[P11]	2	11	0 (0%)	5	0 (0%)	16	0 (0%)		
GI.3[P13] + GI.2	1	4	0 (0%)	4	0 (0%)	8	0 (0%)		
<b>Total GI</b>	<b>10</b>	<b>75</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>54</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>129</b>	<b>0 (0%)</b>		
GII.1[P33]	1	13	0 (0%)	18	0 (0%)	31	0 (0%)		
GII.2[P16]	3	23	6 (26.1%)	10	0 (0%)	33	6 (18.2%)		
GII.4[P16]	4	30	5 (16.7%)	14	2 (14.2%)	44	7 (15.9%)		
GII.4[P31]	2	17	3 (17.6%)	0	0 (0%)	17	3 (17.6%)		
GII.17[P17]	6	57	11 (19.3%)	54	3 (5.5%)	111	14 (12.6%)		
<b>Total GII</b>	<b>16</b>	<b>140</b>	<b>25 (17.9%)</b>	<b>96</b>	<b>5 (5.2%)</b>	<b>236</b>	<b>30 (12.7%)</b>		

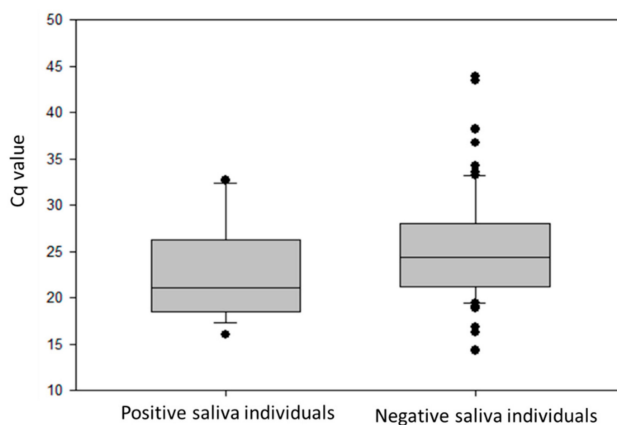
**Table 4.** Risk factors for occurrence of HuNoV in saliva in GII studied cases (\*  $p < 0.05$ ).

Factor	Saliva+		Saliva-	HuNoV Positivity in Saliva	Odds Ratio	CI 95%	p Value
	Yes	No					
Vomiting (n = 105)	16	66	66	19.5%	0.687	0.233–2.021	0.501
	6	17	17	26.1%			
Nausea (n = 90)	12	28	28	30.0%	2.633	0.924–7.497	0.074
	7	43	43	14.0%			
Fever (n = 94)	1	17	17	5.6%	0.176	0.0220–1.416	0.067
	19	57	57	25.0%			
Diarrhea (n = 109)	16	52	52	23.5%	1.495	0.557–4.013	0.440
	7	34	34	17.1%			
Abdominal pain (n = 95)	11	40	40	21.6%	1.069	0.397–2.88	0.900
	9	35	35	20.5%			
Consumption of proton pump inhibitors (n = 85)	5	12	12	29.4%	1.607	0.485–5.322	0.450
	14	54	54	20.6%			
Secretor Status (n = 130)	24	94	94	20.3%	2.809	0.345–22.830	0.352
	1	11	11	8.3%			
Age (n = 129)	18	48	48	27.3%	3.000	1.155–7.791	0.022
	7	56	56	11.1%			
Sex (n = 131)	4	30	30	11.8%	0.482	0.153–1.523	0.216
	21	76	76	21.6%			

CI: confidence interval.

### 3.4. Occurrence of HuNoV RNA in Saliva and Levels of Shedding in Stool

Viral load was examined in stool specimens of GII-infected individuals and compared between groups of cases which were positive or negative for viral RNA in saliva. Mean Cq values obtained during screening were used instead of viral titers (Figure 3). Mean Cq values were significantly higher in the group with positive saliva ( $22.45 \pm 5.02$  versus  $24.89 \pm 4.91$ ,  $p = 0.02$ ), suggesting that the overall level of viral replication in these individuals may be higher.



**Figure 3.** Viral load shed by saliva-positive and saliva-negative subjects under study, represented as box plots (median, quartiles (box), 95% range (whiskers), and outliers (circles)).

### 3.5. Analysis of HuNoV Capsid Integrity in Saliva Using a Viability PMA RTqPCR Assay

In order to examine whether HuNoV RNA was encapsidated and “potentially infectious”, a viability RTqPCR assay using propidium monoazide (PMA) was attempted on one saliva specimen with a high viral load from a subject infected by GII.P16\_GII.2. A previous validation of the PMA RTqPCR assay was performed to confirm the suitability of this procedure to be applied to saliva by artificially spiking a negative saliva specimen with a 10% stool suspension and inactivating the virus by heating the saliva up to  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min (Table 5). The use of PMA reduced the amplification of viral genomes in the heat-inactivated saliva by  $0.97\text{ log}_{10}$ , confirming a good performance. As measured by the PMA-viability assay, heat treatment of spiked saliva resulted in a viral titer decrease of  $>4.75\text{ log}_{10}$  (from  $6.69 \pm 0.01$  to  $1.94 \pm 0.47\text{ log}_{10}$  genome copies/mL). In the naturally contaminated saliva, only a  $0.3\text{ log}_{10}$  reduction was seen by PMA treatment, indicating that approximately 50% of genomes present in saliva were encapsidated within intact capsids and were “potentially infectious”.

**Table 5.** Viability propidium monoazide (PMA) RTqPCR assay of HuNoV GII present in artificially contaminated saliva and in the saliva of one patient.

Sample	Treatment	PMA	HuNoV RNA Log Genome Copies/mL	Log Reduction *
Artificially contaminated saliva	Untreated	-	$6.72 \pm 0.01$	0.03
		+	$6.69 \pm 0.01$	
	5 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$	-	$2.91 \pm 0.03$	0.97
		+	$1.94 \pm 0.47$	
Patient	Untreated	-	3.45	0.30
		+	3.15	

\* Reduction in titers obtained between samples before and after viability pretreatment.

#### 4. Discussion

In our study, we detected HuNoV RNA in 12.1% of studied cases and 3.6% of asymptomatic exposed subjects. This overall prevalence is slightly lower than data reported by Kirby et al. [10], with differences being probably due in part to differences in the date of sample collection and to the fact that our study included cases infected by a higher diversity of genotypes. While all patients included in that previous study were infected by GII.4 or GII.3 strains [10], our study included outbreaks caused by at least nine different genotypes, including both GI and GII. In addition to cases infected by GII.4 strains, we also detected HuNoV RNA in saliva from GII.2 and GII.17 cases. No positive saliva samples were observed for GII.1[P33] cases, probably due in part to the lower number of samples tested for this particular genotype. Of note, we did not detect any positive samples in the saliva from subjects related to GI outbreaks. This finding could be related to different biological properties and/or host responses between GI and GII strains during infection, but differences between sensitivities of GI and GII RTqPCR assays used for screening could also partially explain it. Indeed, the proportion of cases with a negative RTqPCR result in stool was also significantly higher for GI than GII cases (38.6% vs. 20.6%, respectively), suggesting that performance of RTqPCR assays or viral load in stool could differ between the two genogroups. Evidence of the association between viral load and genogroup is limited, but some data indicate that shedding may be higher for GII genotypes [25–27].

An important observation of this study is that subjects with HuNoV occurrence in saliva also shed significantly higher viral loads in stool. This finding suggests that the overall level of viral replication in these individuals may be higher and could translate into differences in the ease of transmission. As highlighted by others [28], differences in viral replication do not clearly correlate with symptoms, which may be more related to the host immune and antiviral responses. In our study, we did not observe a correlation of occurrence of HuNoV in saliva and any of the studied symptoms (diarrhea, abdominal pain, nausea, fever, nausea, and vomiting), consistent with the idea that symptomatology is not associated with increased viral replication. What we did observe was a significant association with age, with individuals  $\geq 65$  years old showing a prevalence of HuNoV RNA in saliva of 27.3%, as compared with 11.1% in younger ones (Table 4). A higher initial viral load, as well as a longer duration of shedding, has been reported for older individuals [29], consistent with a likely higher replication and with the association of saliva positivity and age. In our study, we also found significantly lower mean Cq values in stool for GII-infected individuals  $\geq 65$  years old as compared with younger ones ( $23.42 \pm 5.29$  vs.  $25.45 \pm 5.35$ ,  $p = 0.015$ ), confirming that viral replication was likely higher in the elderly. Of note, this observation was not detected for GI-infected subjects. In addition to a higher level of viral replication, age has also been identified as a risk factor for gastroesophageal reflux disease [30], and it is likely that this could also facilitate the occurrence of HuNoV in saliva.

FUT2 genotyping allowed us to identify 18 nonsecretor subjects who had HuNoV shedding in stool, confirming their infection status, with presentation of acute gastroenteritis symptoms in all of them but one. While symptomatic infection of HuNoV in nonsecretors has been documented for GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3, GII.6, GII.7, GII.4, and GII.17 genotypes [7–9], our report confirms for the first time infection by the GI.4 genotype as well, with sequence confirmation in stool. Binding of GI.4 viruses to carbohydrates from secretor-negative individuals has been documented *in vitro* [31], but to our knowledge, natural infections have not been reported yet. While GII.4 and GII.17 genotypes are thought to be secretor specific [32,33], our study identified one nonsecretor subject infected by GII.4 and three nonsecretor subjects involved in outbreaks caused GII.17. Despite that our data cannot completely rule out that these latter three subjects could have been infected by a different genotype, it is likely that they were infected by the same strain causing the outbreak. Indeed, cases of infections by GII.4 and GII.17 affecting nonsecretors have been documented previously [24,26,34].

The use of clinical specimens from the oral cavity (oral swabs, mouthwash, or saliva) has been assessed by some authors as a suitable alternative specimen to stools for the virological diagnosis of acute gastroenteritis due to its noninvasive nature and ease of collection. As reported by other authors [12], our data clearly support that saliva would not be a suitable specimen. Despite the fact

that we were able to identify positive saliva in individuals who were negative in stool, saliva showed very poor sensitivity compared with stool. Noninvasive saliva testing has, nonetheless, been validated as a useful approach to confirm and rapidly screen HuNoV infection by detection of specific IgA or IgG antibodies [35,36].

Despite an association with vomiting prior to specimen collection having been documented [10,12], our data did not show an association between vomiting or nausea and higher prevalence of HuNoV RNA in saliva. However, in our study, saliva samples had been taken later than 24 h after the onset of symptoms (approximately  $4 \pm 3.4$  days), and this could explain the lack of association. The study published by Zhou et al. [12] also acknowledged the occurrence of HuNoV GII as well as of other enteric viruses such as rotavirus, adenovirus, and astrovirus in oral swabs from children who presented with diarrhea only.

The mechanism behind detection of HuNoV in saliva when the patient does not show vomiting is still unknown. The presence of HuNoV in the absence of preceding vomiting could be explained by reflux of gastrointestinal contents to the oral cavity and binding of viruses to HBGA receptors expressed at the oral cavity, but a low level of viral replication in mucosal epithelial cells of the oral or pharyngeal cavity should not be ruled out. The small intestine is regarded as the primary site for HuNoV infection, and data on which specific cell types are targeted by the virus are just being revealed. Propagation of HuNoV in the human intestinal enteroid culture model indicates that enterocytes are a permissive target cell for viral replication [37], and in-depth histological examination of a pediatric intestinal transplant recipient presenting with severe HuNoV gastroenteritis identified markers of viral replication in specialized epithelial cells of the small intestine with sensory and endocrine functions [38]. Whether a low level of virus could be replicating in a small subset of specialized epithelial cells in the upper gastrointestinal tract and/or the pharynx in certain individuals has not been addressed. Of interest, two recent studies have detected diarrheal viruses, including HuNoV, in the nasopharynx of 11.4% [39] and 15.8% [40] of children with acute gastroenteritis, and a prevalence of 0.5% has also been reported for HuNoV RNA in respiratory secretions of children with influenza-like illness [41]. An independent study on subjects without acute gastroenteritis found HuNoV-specific memory B cells in tonsils [42], although they could not detect any marker of viral replication and they did not explore the origin or the role of these cells in that tissue.

Our data show that occurrence of HuNoV in saliva may not be a common finding to all infected individuals. Differences related to virus strain and host factors such as the occurrence of salivary immunoglobulins or a particular composition of the oral microbiota might explain why not all infected individuals showed HuNoV RNA in their saliva. However, despite not being a widespread phenomenon, the occurrence of HuNoV RNA in saliva opens the door to a possible oral–oral transmission. Although the RNA concentrations of the virus in saliva appear to be much lower than those present in feces, or vomit, given the low infectious dose described for HuNoV [8,43–45], concentrations could be high enough to infect a new host. In addition, using the PMA-RTqPCR viability assay we confirmed that saliva may contain a high proportion of viruses with intact capsids, thus being potentially infectious.

In conclusion, HuNoV may be associated with oral-to-oral transmission through saliva, contributing to the spread of infection. Further studies are needed to evaluate the epidemiological relevance of this transmission mode and to better understand host and viral factors favoring the occurrence of HuNoV in saliva.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.T., C.I., A.D., and S.G.; methodology, E.A.-E., A.S., C.F., E.R., T.C., and N.S.; formal analysis, S.S. and R.B.; investigation, E.A.-E., A.S., and C.F.; data curation, E.A.-E., A.S., E.R., T.C., and L.C.; writing—original draft preparation, E.A.-E. and S.G.; writing—review and editing, S.G., A.D., R.M.P., and A.B.; supervision, S.G.; funding acquisition, A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by the Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/02005 (cofunded by the European Regional Development Fund “Investing in your future”) and the Catalan Agency for the Management of Grants for University (AGAUR Grant Number 2017/SGR 1342).

**Acknowledgments:** 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.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Lopman, B.A.; Steele, D.; Kirkwood, C.D.; Parashar, U.D. The vast and varied global burden of Norovirus: Prospects for prevention and control. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1001999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Atmar, R.L.; Ramani, S.; Estes, M.K. Human noroviruses: Recent advances in a 50-year history. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2018**, *31*, 422–432. [[CrossRef](#)]
3. De Graaf, M.; van Beek, J.; Koopmans, M.P. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 421–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. De Wit, M.A.; Widdowson, M.A.; Vennema, H.; de Bruin, E.; Fernandes, T.; Koopmans, M. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. *J. Infect.* **2007**, *55*, 188–193. [[CrossRef](#)]
5. Sawyer, L.A.; Murphy, J.J.; Kaplan, J.E.; Pinsky, P.F.; Chacon, D.; Walmsley, S.; Schonberger, L.B.; Phillips, A.; Forward, K.; Goldman, C.; et al. 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am. J. Epidemiol.* **1988**, *127*, 1261–1271. [[CrossRef](#)]
6. Chhabra, P.; de Graaf, M.; Parra, G.I.; Chan, M.C.; Green, K.; Martella, V.; Wang, Q.; White, P.A.; Katayama, K.; Vennema, H.; et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1393–1406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nordgren, J.; Svensson, L. Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. *Viruses* **2019**, *11*, 226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Guix, S.; Fuentes, C.; Pinto, R.M.; Blanco, A.; Sabria, A.; Anfruns-Estrada, E.; Garrido, V.R.; Alonso, M.; Bartolome, R.; Cornejo, T.; et al. Infectivity of norovirus GI and GII from bottled mineral water during a waterborne outbreak, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 134–137. [[CrossRef](#)]
9. Currier, R.L.; Payne, D.C.; Staat, M.A.; Selvarangan, R.; Shirley, S.H.; Halasa, N.; Boom, J.A.; Englund, J.A.; Szilagyi, P.G.; Harrison, C.J.; et al. Innate susceptibility to norovirus infections influenced by FUT2 genotype in a United States pediatric population. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 1631–1638. [[CrossRef](#)]
10. Kirby, A.; Dove, W.; Ashton, L.; Hopkins, M.; Cunliffe, N.A. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* **2010**, *48*, 285–287. [[CrossRef](#)]
11. Cheng, V.C.C.; Wong, S.C.; Chiu, K.H.Y.; Yip, C.C.Y.; Wong, S.C.Y.; Yuen, K.Y. Detection of norovirus in air samples in a non-vomiting patient: Implications of testing saliva for norovirus in an immunocompromised host. *J. Hosp. Infect.* **2019**, *103*, 357–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhuo, R.; Parsons, B.D.; Lee, B.E.; Drews, S.J.; Chui, L.; Louie, M.; Crago, B.; Freedman, S.B.; Ali, S.; Pang, X. Identification of enteric viruses in oral swabs from children with acute gastroenteritis. *J. Mol. Diagn.* **2018**, *20*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Escudero-Abarca, B.I.; Rawsthorne, H.; Goulter, R.M.; Suh, S.H.; Jaykus, L.A. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiol.* **2014**, *41*, 91–95. [[CrossRef](#)]
14. Randazzo, W.; Lopez-Galvez, F.; Allende, A.; Aznar, R.; Sanchez, G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *229*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Randazzo, W.; Khezri, M.; Ollivier, J.; Le Guyader, F.S.; Rodriguez-Diaz, J.; Aznar, R.; Sanchez, G. Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *266*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sabria, A.; Pinto, R.M.; Bosch, A.; Bartolome, R.; Cornejo, T.; Torner, N.; Martinez, A.; de Simon, M.; Dominguez, A.; Guix, S. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J. Clin. Virol.* **2014**, *60*, 96–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. ISO15216-2:2019. *Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 2: Method for Detection*; ISO: Geneva, Switzerland, 2019.

18. ISO15216-1:2017. *Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 1: Method for Quantification*; ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
19. Marionneau, S.; Ruvoen, N.; Le Mouillac-Vaidye, B.; Clement, M.; Cailleau-Thomas, A.; Ruiz-Palacois, G.; Huang, P.; Jiang, X.; Le Pendu, J. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1967–1977. [[CrossRef](#)]
20. Van Beek, J.; van der Eijk, A.A.; Fraaij, P.L.; Caliskan, K.; Cransberg, K.; Dalinghaus, M.; Hoek, R.A.; Metselaar, H.J.; Roodnat, J.; Vennema, H.; et al. Chronic norovirus infection among solid organ recipients in a tertiary care hospital, the Netherlands, 2006–2014. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 265. [[CrossRef](#)]
21. Kroneman, A.; Vennema, H.; Deforche, K.; Avoort, H.v.d.; Peñaranda, S.; Oberste, M.S.; Vinjé, J.; Koopmans, M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* **2011**, *51*, 121–125. [[CrossRef](#)]
22. Blanco, A.; Guix, S.; Fuster, N.; Fuentes, C.; Bartolome, R.; Cornejo, T.; Pinto, R.M.; Bosch, A. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1531–1534. [[CrossRef](#)]
23. Sullivan, K.M.; Dean, A.; Soe, M.M. OpenEpi: A web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep.* **2009**, *124*, 471–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Carlsson, B.; Kindberg, E.; Buesa, J.; Rydell, G.E.; Lidón, M.F.; Montava, R.; Mallouh, R.A.; Grah, A.; Rodríguez-Díaz, J.; Bellido, J.; et al. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chan, M.C.; Sung, J.J.; Lam, R.K.; Chan, P.K.; Lee, N.L.; Lai, R.W.; Leung, W.K. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1278–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Costantini, V.P.; Cooper, E.M.; Hardaker, H.L.; Lee, L.E.; Bierhoff, M.; Biggs, C.; Cieslak, P.R.; Hall, A.J.; Vinje, J. Epidemiologic, virologic, and host genetic factors of norovirus outbreaks in long-term care facilities. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cheung, S.K.C.; Kwok, K.; Zhang, L.Y.; Mohammad, K.N.; Lui, G.C.Y.; Lee, N.; Nelson, E.A.S.; Lai, R.W.M.; Leung, T.F.; Chan, P.K.S.; et al. Higher viral load of emerging norovirus GII.P16-GII.2 than pandemic GII.4 and epidemic GII.17, Hong Kong, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 119–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Newman, K.L.; Moe, C.L.; Kirby, A.E.; Flanders, W.D.; Parkos, C.A.; Leon, J.S. Norovirus in symptomatic and asymptomatic individuals: Cytokines and viral shedding. *Clin. Exp. Immunol.* **2016**, *184*, 347–357. [[CrossRef](#)]
29. Lai, C.C.; Wang, Y.H.; Wu, C.Y.; Hung, C.H.; Jiang, D.D.; Wu, F.T. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. *J. Clin. Virol.* **2013**, *56*, 96–101. [[CrossRef](#)]
30. Richter, J.E.; Rubenstein, J.H. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 267–276. [[CrossRef](#)]
31. Shirato, H.; Ogawa, S.; Ito, H.; Sato, T.; Kameyama, A.; Narimatsu, H.; Xiaofan, Z.; Miyamura, T.; Wakita, T.; Ishii, K.; et al. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J. Clin. Virol.* **2008**, *82*, 10756–10767. [[CrossRef](#)]
32. Frenck, R.; Bernstein, D.I.; Xia, M.; Huang, P.; Zhong, W.; Parker, S.; Dickey, M.; McNeal, M.; Jiang, X. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 1386–1393. [[CrossRef](#)]
33. de Graaf, M.; van Beek, J.; Vennema, H.; Podkolzin, A.T.; Hewitt, J.; Bucardo, F.; Templeton, K.; Mans, J.; Nordgren, J.; Reuter, G.; et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus—End of the GII.4 era? *Eurosurveillance* **2015**, *20*, 21178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, X.F.; Huang, Q.; Long, Y.; Jiang, X.; Zhang, T.; Tan, M.; Zhang, Q.L.; Huang, Z.Y.; Li, Y.H.; Ding, Y.Q.; et al. An outbreak caused by GII.17 norovirus with a wide spectrum of HBGA-associated susceptibility. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pisanic, N.; Ballard, S.B.; Colquechagua, F.D.; Francois, R.; Exum, N.; Yori, P.P.; Schwab, K.J.; Granger, D.A.; Detrick, B.; Olortegui, M.P.; et al. Minimally invasive saliva testing to monitor norovirus infection in community settings. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 1234–1242. [[CrossRef](#)]
36. Costantini, V.P.; Cooper, E.M.; Hardaker, H.L.; Lee, L.E.; DeBess, E.E.; Cieslak, P.R.; Hall, A.J.; Vinje, J. Humoral and mucosal immune responses to human norovirus in the elderly. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 1864–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ettayebi, K.; Crawford, S.E.; Murakami, K.; Broughman, J.R.; Karandikar, U.; Tenge, V.R.; Neill, F.H.; Blutt, S.E.; Zeng, X.L.; Qu, L.; et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* **2016**, *353*, 1387–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



38. Green, K.Y.; Kaufman, S.S.; Nagata, B.M.; Chaimongkol, N.; Kim, D.Y.; Levenson, E.A.; Tin, C.M.; Yardley, A.B.; Johnson, J.A.; Barletta, A.B.F.; et al. Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kweon, O.J.; Lim, Y.K.; Kim, H.R.; Kim, T.H.; Lee, M.K. Fecal respiratory viruses in acute viral respiratory infection and nasopharyngeal diarrheal viruses in acute viral gastroenteritis: Clinical impact of ectopic viruses is questionable. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 465–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dabilla, N.; Nunes Vieira Almeida, T.; Carvalho Reboucas Oliveira, A.; Kipnis, A.; Neres Silva, T.; Souza Fiaccadori, F.; Teixeira de Sousa, T.; de Paula Cardoso, D.D.; Souza, M. Norovirus in feces and nasopharyngeal swab of children with and without acute gastroenteritis symptoms: First report of GI.5 in Brazil and GI.3 in nasopharyngeal swab. *J. Clin. Virol.* **2017**, *87*, 60–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Esposito, S.; Daleno, C.; Scala, A.; Senatore, L.; Ascolese, B.; Principi, N. Detection of norovirus in respiratory secretions in children with respiratory tract infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2014**, *33*, 314–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sharma, S.; Hagbom, M.; Nordgren, J.; Frodlund, J.; Hinkula, J.; Ledin, T.; Svensson, L. Detection of rotavirus- and norovirus-specific IgG memory B cells in tonsils. *J. Med. Virol.* **2019**, *91*, 326–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Atmar, R.L.; Opekun, A.R.; Gilger, M.A.; Estes, M.K.; Crawford, S.E.; Neill, F.H.; Ramani, S.; Hill, H.; Ferreira, J.; Graham, D.Y. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 1016–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kirby, A.E.; Teunis, P.F.; Moe, C.L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 166–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Thebault, A.; Teunis, P.F.; Le Pendu, J.; Le Guyader, F.S.; Denis, J.B. Infectivity of GI and GII noroviruses established from oyster related outbreaks. *Epidemics* **2013**, *5*, 98–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# ARTICLE III



### Article III: Effectiveness of consumers washing with sanitizers to reduce human norovirus on mixed salad

Anfruns-Estrada E<sup>†</sup>, Bottaro M<sup>†</sup>, Pintó RM, Guix S, Bosch A.

Foods. 2019;8(12):637. doi: 10.3390/foods8120637

<sup>†</sup>Equally contribution

Els HuNoV són un dels principals patògens adquirits a través del consum d'aliments contaminats. Els productes frescos com vegetals (incloses les amanides RTE), fruites toves o marisc són reconeguts com a vehicles potencials per la transmissió de HuNoV. Tot i els esforços de la indústria alimentària per controlar-ne la contaminació, HuNoV segueix reportat com l'agent causal en una elevada proporció de brots d'origen alimentari. L'adquisició de pràctiques de descontaminació dels productes alimentaris per part dels consumidors, mitjançant el rentat amb desinfectants, resultaria en un hàbit que contribuiria significativament a mitigar el risc d'infecció.

El propòsit del present estudi va ser:

- Avaluar l'eficàcia de diferents agents químics amb un potencial ús domèstic per la inactivació de GI i GII en amanides RTE mitjançant la RTqPCR de viabilitat associada al pre-tractament amb PMA (PMA-RTqPCR), per tal d'evitar la detecció de partícules virals no infeccioses i obtenir una millor avaluació de la reducció de la infectivitat.

Es van inocular a 25 grams d'amanida RTE 100 uL d'una solució de HuNoV GI i GII disposada en forma de petites gotes a la superfície. A continuació, es va deixar reposar cada mostra durant 1 hora a

temperatura ambient i es van testar cadascun dels tres desinfectants a les concentracions següents: l'hipoclorit de sodi a 100 ppm, el PAA a 80 ppm i el diòxid de clor a 20 ppm durant 10 minuts. També es va assajar un rentat amb aigua de l'aixeta solament. Després de cada tractament la mostra va ser esbandida amb 500 ml d'aigua de l'aixeta abans de recuperació de HuNoV.

El rentat de les amanides RTE solament amb aigua de l'aixeta durant 10 minuts va reduir els títols virals inoculats de HuNoV entre 1-1.5 Log<sub>10</sub> tant per GI com per GII. A continuació, emprant cadascun dels desinfectants assajats es va millorar significativament l'eliminació de HuNoV en ambdós genotips.

L'hipoclorit de sodi s'utilitza popularment com a producte desinfectant de l'aigua de rentat gràcies a la seva eficàcia i baix cost, però produeix subproductes poc saludables i la seva eficiència en la desinfecció es redueix en gran mesura per la presència de matèria orgànica. Els àcids orgànics com el PAA es proposen com a alternativa més ecològica a la indústria per evitar la contaminació microbiana, assolint-ne uns nivells d'eliminació acceptables.

Conjuntament, l'hipoclorit de sodi i el PAA van mostrar les eficiències d'eliminació més altes, afegint aproximadament 2 Log<sub>10</sub> addicionals tant per GI com per GII al rentat amb aigua de l'aixeta, a diferència del diòxid de clor que va ser menor. Les eficiències d'eliminació i desinfecció observades per ambdós genogrups no van ser estadísticament diferents en cap dels casos estudiats.

Tant en els assajos amb hipoclorit de sodi com amb PAA s'han assolit constantment més de 3 Log<sub>10</sub> de reducció, posant de manifest la idoneïtat del PAA com a producte alternatiu i menys contaminant per ser emprat en llars domèstiques, així com també pels serveis de càtering

i restauració. Finalment, i una vegada hi hagi prou dades recollides sobre la càrrega viral en aliments contaminats, es podrà avaluar si aquest nivell d'eliminació viral es pot considerar com un objectiu virucida segur en termes de mitigació del risc de HuNoV.



# Effectiveness of Consumers Washing with Sanitizers to Reduce Human Norovirus on Mixed Salad

Eduard Anfruns-Estrada <sup>1,2,†</sup>, Marilisa Bottaro <sup>1,3,†</sup>, Rosa M. Pintó <sup>1,2</sup>, Susana Guix <sup>1,2,\*</sup>  
and Albert Bosch <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; eanfruns@ub.edu (E.A.-E.); marilisa.bottaro@uniba.it (M.B.); rpinto@ub.edu (R.M.P.); abosch@ub.edu (A.B.)

<sup>2</sup> Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), University of Barcelona, Santa Coloma de, 08921 Gramenet, Spain

<sup>3</sup> Department of Veterinary Medicine, University of Bari Aldo Moro, 70010 Bari, Italy

\* Correspondence: susanaguix@ub.edu; Tel.: +34-934021489

† Equal contribution.

Received: 30 September 2019; Accepted: 29 November 2019; Published: 3 December 2019

**Abstract:** Human norovirus (HuNoV) is a foremost cause of domestically acquired foodborne acute gastroenteritis and outbreaks. Despite industrial efforts to control HuNoV contamination of foods, its prevalence in foodstuffs at retail is significant. HuNoV infections are often associated with the consumption of contaminated produce, including ready-to-eat (RTE) salads. Decontamination of produce by washing with disinfectants is a consumer habit which could significantly contribute to mitigate the risk of infection. The aim of our study was to measure the effectiveness of chemical sanitizers in inactivating genogroup I and II HuNoV strains on mixed salads using a propidium monoazide (PMAxx)-viability RTqPCR assay. Addition of sodium hypochlorite, peracetic acid, or chlorine dioxide significantly enhanced viral removal as compared with water alone. Peracetic acid provided the highest effectiveness, with  $\log_{10}$  reductions on virus levels of  $3.66 \pm 0.40$  and  $3.33 \pm 0.19$  for genogroup I and II, respectively. Chlorine dioxide showed lower disinfection efficiency. Our results provide information useful to the food industry and final consumers for improving the microbiological safety of fresh products in relation to foodborne viruses.

**Keywords:** human norovirus; leafy greens; disinfection; chlorine; peracetic acid; PMAxx-viability RTqPCR

---

## 1. Introduction

Human noroviruses (HuNoVs), members of the family *Caliciviridae*, are recognized as a leading cause of outbreaks of acute viral gastroenteritis and foodborne illness worldwide, affecting all age groups. Globally, HuNoVs account for 18% of all cases of acute gastroenteritis [1] and 18% of all foodborne illnesses [2]. The general population is broadly vulnerable to HuNoV disease across all age groups, but the majority of morbidity and mortality occurs at the extremes of age. The fecal–oral route is the main mode of transmission, although several other modalities have been described. These modalities include transmission via aerosolized viral particles in vomitus, environmental contamination, and through food and water, chiefly shellfish, soft fruit, and vegetables [3,4]. Fresh produce such as leafy greens and fruits contaminated with HuNoV have become increasingly recognized as potential vehicles of HuNoV transmission; being increasingly reported as a causative agent in a high proportion of outbreaks in many parts of the world in the last years [5–7]. In addition, HuNoV was reported in 29% of all alerts reported in the



Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF; [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en)) system in 2017 on fruits and vegetables.

HuNoVs may contaminate fruits and vegetables at any point of the production chain, including cultivation before harvest or post-harvest. Contamination by an infected food handler and exposure to fecally contaminated water during irrigation are thought to be the most frequent modes of HuNoV contamination of foods moving through the farm-to-fork continuum [8,9]. They are able to survive outside the host and remain relatively stable under food processing and storage conditions (reviewed by [10]). Of note, in 2010, vegetables contaminated with HuNoV, especially lettuce, accounted for 50% of the outbreaks attributed to vegetables, fruits, and products thereof which were reported in Europe [11], and the importance of contaminated vegetables as the food vehicle implicated in a significant number of 2009–2012 outbreaks in the United States has also been reported [12]. Although Baert et al. (2011) [13] reported notably high HuNoV prevalence in leafy greens during 2009–2010 in Belgium and France, most recent screenings during 2011–2017 from Italy and the UK report lower prevalence, ranging from 0%–5% (reviewed by [14,15]), but the number of studies may be insufficient to determine whether a change over the years is occurring. Additionally, leafy green contamination may also depend on the epidemiology of HuNoV in the population during that period.

Preventative processing strategies are promising means to reduce occurrence of HuNoV contamination at retail in such products, or at least reduce viral loads, and washing of harvested produce is a common practice in the food industry. Decontamination of produce using different disinfectants has been evaluated [16–19], but due to the high variability of food matrices and the recent development of novel capsid integrity assays which provide a better correlation with infectivity [20,21], new investigations and intervention measures in the food chain of vegetables still need to be evaluated for their efficacy in viral inactivation.

The purpose of our study was to evaluate the effectiveness of different chemical agents with a potential to be used domestically, in inactivating HuNoVs genogroup I (GI) and genogroup II (GII) strains on vegetables purchased from Spanish supermarkets, using a viability RTqPCR assay to avoid detection of noninfectious viral particles and obtain a better assessment of infectivity reduction.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Human Noroviruses

Stool specimens positive for HuNoV GI and GII were obtained from patients with gastroenteritis from outbreaks declared to the Public Health Agency of Catalonia (kindly provided by R. Bartolomé from the Hospital Universitari Vall d’Hebron, Spain) and were used as HuNoV reference material. HuNoV genotypes were identified as GI.3 and GII.2, as previously described [22]. HuNoV stool samples were suspended (10%, wt/vol) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer and pelleted at  $10,000\times g$  for 5 min. Fecal suspension was not filtered in order to better mimic what would occur under natural conditions. The supernatant was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in aliquots. These supernatants were retained for RNA extraction and RTqPCR quantification, following the protocol described at the ISO 15216-1:2017 [23]. Briefly, RNA was extracted using the NucliSens® miniMAG magnetic system (BioMérieux, France) following the manufacturer’s instructions, and viral genomes were quantitated by a duplex RTqPCR reaction using the previously validated primers and probes [23] and using the RNA UltraSense One-Step quantitative RT-PCR system (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) and the Stratagene Mx3000P system. Forward primer, reverse primer, and probe concentrations were 500, 900, and 250 nM, respectively. Cycling parameters for duplex RTqPCR assays were 1 h at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , followed by 5 min at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and 45 cycles of 15 s at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and 1 min at  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The standard curves

were obtained using double-stranded synthetic DNA containing the corresponding target GI and GII sequences.

## 2.2. Spiking of NoV GI and GII onto Fresh Produce

Ready-to-eat (RTE) mixed salad samples (containing 82% iceberg lettuce, 10% red cabbage, and 8% sliced carrots) were obtained from a local supermarket. Then, 25 g of sample was spiked with 100  $\mu$ L of the appropriate dilution of each viral stock solution to obtain  $8 \times 10^6$  genome copies for GI and  $1.2 \times 10^7$  genome copies for GII. Each inoculum was spotted by using a micropipette with about 50 to 100 drops on the surface of each sample. The inoculum was allowed to adsorb for 1 h under a laminar flow hood at room temperature (RT) to ensure the drying and adhesion of the viral particles. Non-inoculated mixed salad samples were used as negative controls to exclude the occurrence of natural contamination of the samples.

## 2.3. Chemical Disinfection Treatment

Sanitizers concentrations tested were selected based on label indications and FDA (Food and Drug Administration) recommendations. Household bleach was used as a source of sodium hypochlorite, following the manufacturer's instructions for produce disinfection. Peracetic acid (PAA) was obtained from Merck Millipore, and chlorine dioxide (DK-DOX® AGRAR) was purchased from APURA (Gargnano, Italy). Sodium hypochlorite was tested at 100 ppm, peracetic acid at 80 ppm, and chlorine dioxide at 20 ppm. Each disinfectant solution was freshly prepared for each experiment at the desired concentrations in tap water (pH 7.3; conductivity 1000  $\mu$ S/cm), to better mimic what would occur in domestic kitchens and households. Spiked samples were gently immersed in each disinfectant solution for 10 min without agitation at RT, and samples washed in parallel with tap water only were also included. After treatment, the food surface was rinsed with 500 mL of tap water before the virus recovery steps. Inoculated and unwashed samples were used as positive controls.

## 2.4. Sample Processing for Virus Extraction and Quantification

Virus extraction was performed following the ISO 15216-1:2017 [23]. Limit of detection of the analysis of HuNoV on lettuce using the ISO 15216-1:2017 was of 0.46 and 0.88 copies/g for GI and GII, respectively [24]. Briefly, 25 g of sample was added to 40 mL of Tris/glycine/beef extract (TGBE) buffer pH 9.5 (100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 1% beef extract) and 10  $\mu$ L of Mengovirus as a process control virus material. The eluate was concentrated with 5 $\times$  polyethylene glycol (PEG)/NaCl solution (50% (w/v) PEG 8000, 1.5 M NaCl). Viruses were concentrated by centrifuging the solution at 10,000 $\times$  g for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. The pellet was re-suspended in 500  $\mu$ L of PBS. Viral genome quantification was performed by propidium monoazide (PMAxx)-viability RTqPCR assay, as previously described [20,25], with minor modifications. Briefly, sample extracts were incubated with 50  $\mu$ M PMAxx (Biotinum) and 0.5% Triton X-100 in the dark at RT for 10 min at 150 rpm. Samples were then exposed to light for 15 min using a photo activation system (Led-Active Blue, Geniul) and subsequently extracted using the NucliSens® miniMAG magnetic kit (BioMérieux) according to the manufacturer's instructions. HuNoV GI and GII genomes were quantitated by a duplex RTqPCR reaction as described above. For each sample, extraction efficiency was monitored by performing a monoplex RTqPCR assay using Mengovirus specific primers, and RT-PCR inhibition was assessed using an external control RNA, as described [23].

## 2.5. Data Analysis

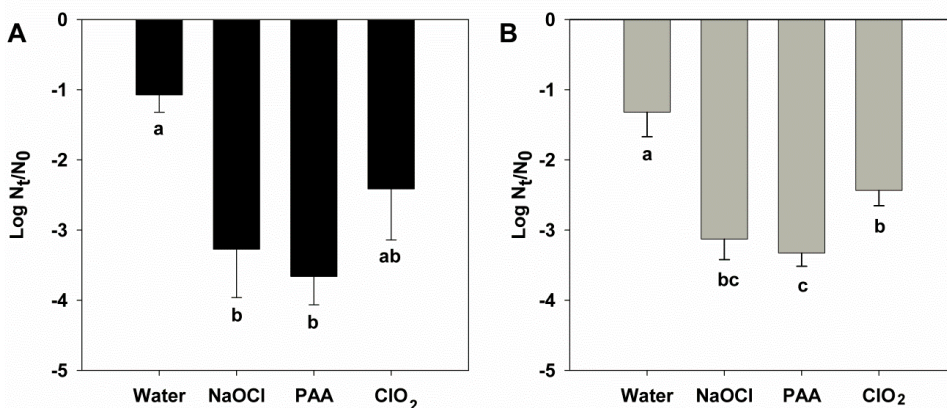
Each condition was assayed in three–four independent biological experiments performed on separate days and performed by two different workers. Viruses from each sample were extracted and titrated by RTqPCR in duplicate wells. Effect of the sanitizer wash on virus reduction was

determined by calculating the log units ( $N_t/N_0$ ), where  $N_0$  is the titer of virus recovered on unwashed control samples and  $N_t$  is the titer of virus recovered on washed sample. Differences between sanitizer types or genogroups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) ( $p < 0.05$ ), using SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, NY, USA)

### 3. Results

Results obtained of HuNoV removal during washing procedures are shown in Figure 1. A 10 min washing step with tap water alone reduced viral titers for both HuNoV GI and GII by  $1.08 \pm 0.25$  and  $1.32 \pm 0.35 \log_{10}$ , respectively. The three tested disinfectants significantly enhanced the removal of both genogroups, as compared with washing with water alone. Sodium hypochlorite and PAA showed the highest removal efficiencies, which were similar for both genogroups, adding approximately 2  $\log_{10}$  inactivation in all cases as compared with water. Removal/disinfection efficiencies observed for GI and GII were not statistically different. PAA provided the highest effectiveness, with  $\log_{10}$  reductions on virus levels of  $3.66 \pm 0.40$  and  $3.33 \pm 0.19$  for GI and GII, respectively. Since all measurements were performed including a PMAxx treatment prior to RTqPCR, final titers correspond to viruses with undamaged capsids.

The following parameters were measured to control the performance of the method. Average percentage recovery of Mengovirus process control virus was  $40.6\% \pm 44.9\%$ . Average percentage recoveries of inoculated HuNoV GI and GII were  $15.3\% \pm 11.6\%$  and  $22.7\% \pm 16.8\%$ , respectively. Average percentages of RTqPCR efficiencies as measured by external RNA controls for GI and GII were  $60.7\% \pm 16.6\%$  and  $65.1\% \pm 26.1\%$ , respectively. No changes in the aspect of mixed salads were noticed with any of the treatments conducted.



**Figure 1.** Reduction of human norovirus (HuNoV) genogroup I (GI) (A) and genogroup II (GII) (B) genomes on salad, as measured by PMA-RTqPCR, after 10 min wash with water alone, sodium water containing sodium hypochlorite (NaOCl) at 100 ppm, peracetic acid (PAA) at 80 ppm, and chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) at 20 ppm. Each data bar represents an average of three–four independent experiments, and error bar shows the standard deviation. Different letters indicate a significant ( $p < 0.05$ ) effect between treatments for each genogroup.  $N_0$ : original virus titer;  $N_t$ : virus titer after treatment.

None of the 30 non-inoculated RTE samples tested positive for HuNoV GI and GII, suggesting a low prevalence of naturally contaminated samples in RTE salads at retail.

#### 4. Discussion

The aim of this study was to assess the efficacy of chemical disinfectants (sodium hypochlorite, peracetic acid, and chlorine dioxide) at decontaminating vegetables spiked with HuNoV GI and GII, using a viability RTqPCR assay to obtain a better assessment of infectivity reduction. The disinfectants used in this study are on the list approved by the FDA for the washing of fruits and vegetables, and their effectiveness and limitations have been extensively studied [26,27]. They were also chosen for our study based on their potential ease of their domestic use. Sodium hypochlorite is popularly used as a produce wash water sanitizer due to its documented efficacy and low cost, but it produces unhealthy by-products and its efficiency in disinfection is largely reduced by the presence of organic matter. Chlorine and its derivatives have, however, been in the spotlight due to environmental concerns. Certain organic acids such as PAA are frequently proposed as “natural” approaches to prevent microbial contamination. In the fresh-cut industry, PAA is often used as a commercial sanitizer in combination with other organic acids and hydrogen peroxide, producing acceptable microbial mortality levels. Finally, chlorine dioxide has received more attention as a decontaminant for vegetables and fruits because it is less affected by pH, it does not form organohalogen by-products, and its oxidative power is stronger than that of sodium hypochlorite [27].

Sensitivity of noroviruses to chlorine and other sanitizers has been proven on different food matrices using the murine norovirus surrogate measured by infectivity assays as well as human viruses measured by viral genome reduction [10,14], but very few studies have used viability RTqPCR assays to better estimate the achieved reduction in HuNoV infectivity [28].

Suitability of PMAxx-RTqPCR for discrimination between potentially infectious enteric viruses and viruses with structural damages caused by chemical disinfectants has been confirmed by others and us [25,28–30], but these assays have not been extensively used yet on viral inactivation studies. Although the human intestinal enteroid model [31] would be the best tool to determine the efficacy of inactivation procedures [32], the use of this system on a routine basis to provide quantitative estimates of  $\log_{10}$  reduction levels is still unaffordable for most laboratories.

Our results show that while reductions observed by PMAxx-RTqPCR assay after washing with water alone were similar to previously reported data (which range between 0.1 and 1.8  $\log_{10}$ ) [33,34], total reductions observed with sodium hypochlorite (100 ppm) and PAA (80 ppm) consistently reached over 3  $\log_{10}$  reduction, which is higher than what has been published by other studies using similar disinfection treatments on other enteric viral targets when measured by conventional RTqPCR assays [16,17,35]. We believe that the higher log reductions observed in our study may be primarily explained by the longer exposure time used (10 min), but also the use of PMAxx-RTqPCR assay to measure only recovered viruses with intact capsids. Although our data cannot confirm whether the disinfection treatments performed rendered some viruses noninfectious due to structural damages, we show that sodium hypochlorite (100 ppm) or PAA (80 ppm) may ensure a complete HuNoV elimination from mixed salad samples if the virus is present in numbers lower than 3  $\log_{10}$ . Once sufficient data on viral load occurring on contaminated produce products are gathered, it will be possible to assess whether this level of viral removal can be regarded as a safe virucidal objective in terms of risk mitigation. Of interest, PAA, which has a growing popularity from a safety and environmental perspective, showed an efficacy similar to sodium hypochlorite, confirming its potential as an alternative to chlorine [27]. Of note, PAA has also been proven to be more effective than sodium hypochlorite and chloride dioxide on lettuce to remove murine norovirus [17]. Finally, our results also showed similar behaviors for both HuNoV genogroups. Differences with previous observations showing a higher resistance of GII to free chlorine [18] or chlorine dioxide [28] may be partially explained by the use of different viral genotypes or different types of matrices. In addition, the study performed by Dunkin et al. [18] did not use the PMAxx-RTqPCR assay, which avoids detection of viruses with compromised capsids.

As a conclusion, our data confirm the suitability of sodium hypochlorite and especially PAA as disinfectants to be applied in the fresh-cut industry, in combination with an optimal management of hygiene and control of other critical points of possible contamination defined by Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) plans. Since both products may also be potentially used in domestic households, as well as in catering services and in restoration, their implementation as produce chemical disinfectants should be reinforced in these settings, in order to mitigate the risk of HuNoV infections when contamination at retail is not completely prevented.

**Author Contributions:** conceptualization, M.B., A.B., S.G. and R.M.P.; methodology, E.A. and M.B.; formal analysis, E.A., M.B., S.G.; writing—original draft preparation, M.B. and S.G.; writing—review and editing, R.M.P. and A.B.; funding acquisition, A.B.

**Funding:** This work was funded by project “SafeConsume: Safer food through changed consumer behavior: Effective tools and products, information strategies, education and a food safety policy reducing health burden from foodborne illnesses (No. 727580)” of European Union’s 8P32FS—Horizon 2020 programme. M. Bottaro was recipient of a traineeship from the Erasmus+ Programme.

**Acknowledgments:** We are thankful to Rosa Bartolomé from Hospital Universitari Vall d’Hebron for providing HuNoV clinical specimens.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Ahmed, S.M.; Hall, A.J.; Robinson, A.E.; Verhoef, L.; Premkumar, P.; Parashar, U.D.; Koopmans, M.; Lopman, B.A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 725–730, doi:10.1016/s1473-3099(14)70767-4.
2. Havelaar, A.H.; Kirk, M.D.; Torgerson, P.R.; Gibb, H.J.; Hald, T.; Lake, R.J.; Praet, N.; Bellinger, D.C.; de Silva, N.R.; Gargouri, N.; et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* **2015**, *12*, e1001923, doi:10.1371/journal.pmed.1001923.
3. Robilotti, E.; Deresinski, S.; Pinsky, B.A. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 134–164, doi:10.1128/CMR.00075-14.
4. de Graaf, M.; van Beek, J.; Koopmans, M.P.G. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 421, doi:10.1038/nrmicro.2016.48.
5. ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4634, doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.
6. ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **2018**, *16*, 5500, doi:10.2903/j.efsa.2018.5500.
7. Li, M.; Baker, C.A.; Danyluk, M.D.; Belanger, P.; Boelaert, F.; Cressey, P.; Gheorghe, M.; Polkinghorne, B.; Toyofuku, H.; Havelaar, A.H. Identification of Biological Hazards in Produce Consumed in Industrialized Countries: A Review. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1171–1186, doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-465.
8. Aron, J.H.; Valerie, G.E.; Amy Lehman, E.; Gould, L.H.; Ben, A.L.; Umesh, D.P. Epidemiology of Foodborne Norovirus Outbreaks, United States, 2001–2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1566, doi:10.3201/eid1810.120833.
9. Kokkinos, P.; Kozyra, I.; Lazić, S.; Söderberg, K.; Vasickova, P.; Bouwknegt, M.; Rutjes, S.; Willems, K.; Moloney, R.; de Roda Husman, A.M.; et al. Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food Environ. Virol.* **2017**, *9*, 72–78, doi:10.1007/s12560-016-9264-2.
10. Cook, N.; Knight, A.; Richards, G.P. Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: A Critical Review. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 1273–1294, doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-570.

11. ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2597.
12. Hall, A.J.; Wikswo, M.E.; Pringle, K.; Gould, L.H.; Parashar, U.D. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC. Vital signs: Foodborne norovirus outbreaks—United States, 2009–2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2014**, *63*, 491–495.
13. Baert, L.; Mattison, K.; Loisy-Hamon, F.; Harlow, J.; Martyres, A.; Lebeau, B.; Stals, A.; Van Coillie, E.; Herman, L.; Uyttendaele, M. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 261–269, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013.
14. Guix, S.; Pinto, R.M.; Bosch, A. Final Consumer Options to Control and Prevent Foodborne Norovirus Infections. *Viruses* **2019**, *11*, 333, doi:10.3390/v11040333
15. Cook, N.; Williams, L.; D’Agostino, M. Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Food Microbiol.* **2019**, *79*, 85–89, doi:10.1016/j.fm.2018.12.003.
16. Fraisse, A.; Temmam, S.; Deboosere, N.; Guillier, L.; Delobel, A.; Maris, P.; Vialette, M.; Morin, T.; Perelle, S. Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 98–104.
17. Girard, M.; Mattison, K.; Fliss, I.; Jean, J. Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *219*, 7–11, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.015.
18. Dunkin, N.; Weng, S.; Jacangelo, J.G.; Schwab, K.J. Inactivation of Human Norovirus Genogroups I and II and Surrogates by Free Chlorine in Postharvest Leafy Green Wash Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e01457-17, doi:10.1128/aem.01457-17.
19. Dunkin, N.; Coulter, C.; Weng, S.; Jacangelo, J.G.; Schwab, K.J. Effects of pH Variability on Peracetic Acid Reduction of Human Norovirus GI, GII RNA, and Infectivity Plus RNA Reduction of Selected Surrogates. *Food Environ. Virol.* **2018**, doi:10.1007/s12560-018-9359-z.
20. Randazzo, W.; López-Gálvez, F.; Allende, A.; Aznar, R.; Sánchez, G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *229*, 1–6, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010.
21. Manuel, C.S.; Moore, M.D.; Jaykus, L.-A. Predicting human norovirus infectivity—Recent advances and continued challenges. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 337–345, doi:10.1016/j.fm.2018.06.015.
22. Sabria, A.; Pinto, R.M.; Bosch, A.; Bartolome, R.; Cornejo, T.; Torner, N.; Martinez, A.; de Simon, M.; Dominguez, A.; Guix, S. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J. Clin. Virol.* **2014**, *60*, 96–104, doi:10.1016/j.jcv.2014.03.013.
23. ISO15216-1:2017. *Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 1: Method for Quantification*; ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
24. Lowther, J.A.; Bosch, A.; Butot, S.; Ollivier, J.; Mäde, D.; Rutjes, S.A.; Hardouin, G.; Lombard, B.; In’t Veld, P.; Leclercq, A. Validation of EN ISO method 15216—Part 1—Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *288*, 82–90, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014.
25. Fuster, N.; Pintó, R.M.; Fuentes, C.; Beguiristain, N.; Bosch, A.; Guix, S. Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res.* **2016**, *101*, 226–232. doi:10.1016/j.watres.2016.05.086.
26. Banach, J.L.; Sampers, I.; Van Haute, S.; van der Fels-Klerx, H.J. Effect of Disinfectants on Preventing the Cross-Contamination of Pathogens in Fresh Produce Washing Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 8658–8677, doi:10.3390/ijerph120808658.
27. Yoon, J.H.; Lee, S.Y. Review: Comparison of the effectiveness of decontaminating strategies for fresh fruits and vegetables and related limitations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 3189–3208, doi:10.1080/10408398.2017.1354813.
28. López-Gálvez, F.; Randazzo, W.; Vásquez, A.; Sánchez, G.; Decol, L.T.; Aznar, R.; Gil, M.I.; Allende, A. Irrigating Lettuce with Wastewater Effluent: Does Disinfection with Chlorine Dioxide Inactivate Viruses? *J. Environ. Qual.* **2018**, *47*, 1139–1145, doi:10.2134/jeq2017.12.0485.

29. Parshionikar, S.; Laseke, I.; Fout, G.S. Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4318–4326, doi:10.1128/aem.02800-09.
30. Leifels, M.; Jurzik, L.; Wilhelm, M.; Hamza, I.A. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2015**, doi:10.1016/j.ijheh.2015.02.003.
31. Ettayebi, K.; Crawford, S.E.; Murakami, K.; Broughman, J.R.; Karandikar, U.; Tenge, V.R.; Neill, F.H.; Blutt, S.E.; Zeng, X.-L.; Qu, L.; et al. Replication of human noroviruses in stem cell–derived human enteroids. *Science* **2016**, *353*, 1387–1393, doi:10.1126/science.aaf5211.
32. Costantini, V.; Morantz, E.K.; Browne, H.; Ettayebi, K.; Zeng, X.L.; Atmar, R.L.; Estes, M.K.; Vinje, J. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 1453–1464, doi:10.3201/eid2408.180126.
33. Butot, S.; Putallaz, T.; Sanchez, G. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126*, 30–35, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.033.
34. Bae, J.Y.; Lee, J.S.; Shin, M.H.; Lee, S.H.; Hwang, I.G. Effect of wash treatments on reducing human norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 1908–1911, doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-063.
35. Baert, L.; Vandekinderen, I.; Devlieghere, F.; Van Coillie, E.; Debevere, J.; Uyttendaele, M. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 1047–1054.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# DISCUSSIÓ GENERAL





## Discussió general

Els HuNoV causen GEA en humans i afecten a tots els grups d'edat, representant un dels virus més rellevants en l'àmbit de la salut pública i de la seguretat alimentària.

La seva distribució geogràfica és mundial mostrant taxes d'incidència d'entre 380-1040 casos per 10.000 habitants en països industrialitzats segons l'època de l'any (302-305). La població <5 anys és la que en concentra un major número de casos, podent augmentar l'anterior taxa d'incidència fins a 6.5 vegades. Al seu torn, la població >65 anys també és considerada un grup d'edat vulnerable per aquests agents vírics, ja que és en aquest franja on es concentren el 40% de les hospitalitzacions i el 90% de les morts associades, fet que suposa un notable impacte pel servei de salut (306-308).

En aquest context, la present tesi doctoral s'ha iniciat amb l'estudi i la caracterització de l'epidemiologia clínica i molecular dels brots de GEA que tenen com a origen HuNoV, decretats a Catalunya en un període d'estudi de tres anys. Per conèixer l'últim estudi de brots i diversitat de genotips de HuNoV disponible arreu del territori català ens hem de remuntar al període 2010-2012 dut a terme per *Sabrià et al.* (5). Posteriorment, a Catalunya també s'han dut a terme altres estudis clínics i ambientals (198, 309-313) de determinats brots ocorreguts al país, a diferència de l'Estat Espanyol on la investigació de brots de HuNoV ha resultat més limitada (314-316).

Els brots de GEA per HuNoV són particularment freqüents en institucions tancades i semi-tancades tals com hospitals, residències geriàtriques i escoles (317, 318). El mecanisme de transmissió més important en els

brots interpersonalment de GEA per HuNoV és la via fecal oral, però hi ha diverses evidències que el vòmit també té un paper molt important (319). Per altra banda, en un estudi realitzat amb mostres de pacients afectats en dos brots, l'RNA de HuNoV també es va detectar, a part de la femta, en mostres obtingudes per rentat bucal, tot i que alguns d'aquests individus infectats no haguessin presentat vòmits. D'aquesta manera, es va voler estudiar també l'abast que aquest tipus de mostres de saliva podria tenir per a constituir un nou enfocament diagnòstic per a la detecció de la infecció de HuNoV (218). D'aquests estudis se n'han realitzat els articles I i II.

Una altra de les vies d'infecció de HuNoV és a través del consum d'aliments contaminats, especialment si es mengen crus o cuinats insuficientment per a la correcta inactivació de HuNoV. A part dels mol·luscs bivalves, les fruites i verdures es reconeixen cada cop més com a vehicles potencials per la seva transmissió. Aquestes poden ser contaminades en qualsevol dels punts de la cadena de producció, inclòs el cultiu abans o després de la collita. Estudis de prevalença realitzats recentment han descrit valors de positivitat de HuNoV entre un 0-5.3% en amanides RTE (186-188). Tanmateix, estudis més antics informen de prevalences notablement més elevades que oscil·len entre >10% en hortalisses i <34% en fruites toves analitzades que restaven llestes per consumir (320, 321).

El risc d'adquirir la infecció per HuNoV pot anar més enllà i associar-se també a la transferència de partícules víriques durant la preparació d'aliments, per part de persones que estiguin en període d'excreció cap a la resta de consumidors mitjançant la manipulació dels aliments (18, 194). D'aquesta manera, per minimitzar aquest risc potencial d'infecció, els consumidors podrien considerar la descontaminació d'aquest tipus

d'aliments mitjançant la utilització de diferents desinfectants. D'aquest estudi se n'ha generat l'article III.

### **Estudi de la epidemiologia i genotip dels brots de HuNoV i de la seva presència i caracterització en mostres de saliva d'individus afectats**

El primer article de la present tesi doctoral està centrat en l'estudi de l'epidemiologia i el genotip dels virus causants dels brots de HuNoV declarats durant el període 2017-2019 a Catalunya. Ateses les dificultats que existeixen per la identificació dels casos totals de GEA d'etiologia vírica, una aproximació acceptada (tot i que subestimada) com a mètode apropiat per a la investigació sobre la epidemiologia d'aquests agents és l'estudi dels brots ocasionats.

L'estudi de brots permet copsar i conèixer millor el comportament de l'agent, identificar més fàcilment quins són els mecanismes de transmissió i origen i estudiar-ne el seu abast; dades més dificultoses de recopilar a través dels casos esporàdics. Durant aquests tres anys d'estudi es van incloure un total de 100 brots reportats per les diverses UVE, produïts en comunitats tancades i semi-tancades on HuNoV n'era l'agent causal, i dels quals es disposava d'informació epidemiològica del brot i dels individus afectats.

Si bé els brots de HuNoV poden tenir lloc en qualsevol moment de l'any, àmpliament s'han distribuït dins d'un patró estacional afavorit durant els mesos més freds de l'any (octubre-març), en comparació amb els mesos més càlids (abril-setembre). La resistència del virus a les baixes temperatures, i conjuntament amb els patrons de comportament associats com compartir espais interiors amb més freqüència i consegüentment en una major proximitat, n'afavoreixen la seva

transmissibilitat (322). Aquest fet es corrobora a l'estudi, on un 68% dels brots decretats van ser en l'època freda de l'any. Tot i això, a l'article existeix una associació major a l'estacionalitat pel GII, o més concretament pel GII.4, que no respecte GI (323).

Al 70% dels brots es va identificar la presència del GII com a agent responsable, mostrant un clar predomini sobre GI representant un 27%, i pels brots múltiples tant per GI com GII en un 3%; reforçant la predominança de la circulació de GII com succeeix en moltes parts del món (324). En 93 brots es va aconseguir obtenir el genotip específic del virus, amb informació tant de la RdRp com de la VP1 gràcies al tipatge dual per identificar les formes recombinants (69). En cas de GII es van descriure 15 genotips diferents, i 6 per GI. D'entre ells, el que més vegades es va identificar va ser el GII.4[P31] Sydney 2012 en 14 brots, seguidament de GII.4[P16] Sydney 2012 i GII.2[P16] en 12. Només els 5 genotips següents GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4[P16] Sydney 2012, GII.4[P31] Sydney 2012 i GII.17[P17] es van detectar de manera consistent cada any, i d'ells, només GII.2[P16] va mostrar una tendència negativa al llarg del temps.

En comparació amb els resultats obtinguts en un estudi semblant de seguiment i evolució dels genotips causants de brots de HuNoV a Catalunya durant el període 2010-2012 (5) es constaten les observacions següents. En primer lloc, a l'estudi anterior el genotip de la càpsida GII.4 (el sistema de genotipat dual amb informació de la RdRp es va implementar posteriorment) va ser identificat en 66 dels 103 brots genotipats, i en el present estudi en 27 dels 93, experimentant una forta reducció. Per altra banda, aquest fet es compensa amb un augment de la presència de GI, passant de ser el genogrup identificat en 6 brots a ser-ho en 27, i conseqüentment mostrant una diversitat de genotips

major, on d'entre ells se'n destaca el Gl.3[P3], Gl.4[P4] i Gl.1[P1]. També, per primera vegada apareix descrita la presència del genotip Gll.17[P17] emergent a l'hivern del 2014 a la Xina (325), i del Gll.2[P16] al 2016 a Alemanya (91), ambdós precedits per un fort augment en el número de brots i casos de GEA, i posteriorment distribuïnt-se arreu del món (81, 85, 86, 326–328). El fet de viure en una societat moderna dins d'un món globalitzat permet que la població es vegi ràpidament afectada enfront de nous genotips emergents, i que la càrrega de la malaltia per HuNoV pugui ser major.

Les diferències entre l'aparició i freqüència dels diversos genotips entre diferents períodes d'estudi poden ser degudes tant a una tendència emergent per algun genotip no identificat prèviament, a una menor o major persistència al medi, o a una absència d'immunitat tant individual com de ramat. La immunitat pels diversos genotips de HuNoV sol ser de curta durada, on una hipotètica nova exposició enfront el mateix genotip en els dotze mesos posteriors probablement podria protegir-nos enfront d'una infecció simptomàtica. D'aquesta manera, la pèrdua d'immunitat adquirida ens fa més vulnerables a una re-infecció a mesura que avança el temps, esdevenint pràcticament nul·la més enllà d'un any (329).

Dins del Gll, el genotip de la càpsida Gll.4 ha estat el més predominant a tot el món durant més de 20 anys, amb diferents variants que han anat apareixent periòdicament cada 2-3 anys i substituint la variant anterior que circulava (76). Actualment però, des de l'última variant Gll.4 Sydney 2012 la càpsida no ha evolucionat antigènicament, però des del 2015 apareix recombinada amb la RdRp Gll.P16 (330). Aquest genotip de la RdRp va ser el més freqüentment identificat a l'article I en el 25% dels brots, apareixent, a part de recombinat amb el genotip de la

càpsida GII.4 (GII.4[P16] Sydney 2012), amb els genotips GII.2 i GII.10 encara que també es pot unir a GII.1, GII.3, GII.13 i GII.12 (74, 331).

La diversitat entre HuNoV es manté gràcies a l'acumulació de mutacions produïdes i associades a la naturalesa intrínseca de les RdRp víriques durant la replicació, i a la recombinació genètica que pot implicar un intercanvi de seqüències entre HuNoV pel solapament entre l'ORF1 i ORF2. Aquesta naturalesa propensa a la generació d'errors durant la transcripció pot conduir a mutacions puntuals conservades, ja siguin silencioses o donant lloc a substitucions d'aminoàcids (332). Així, diverses característiques dels virus RNA com són una elevada variació antigènica, diversitat genotípica i l'evasió del sistema immune, s'atribueixen a aquesta manca de correcció de les RdRp víriques (333). L'aparició d'aquestes mutacions al genoma en representa un dels seus mecanismes evolutius, i que en el cas de la RdRp GII.P16 se n'hauria pogut millorar la seva funció i transmissió, incrementant-ne el seu *fitness* (90). Aquest fet, conjuntament amb la ràpida evolució de les càpsides GII.4 (297) i que presenten una capacitat d'evasió major a les respostes del sistema immunitari de l'hoste (334), possibilita que el genotip (GII.4[P16] Sydney 2012) es propagui més fàcilment i esdevingui el genotip, si no més prevalent, un dels més àmpliament responsables d'un elevat número de casos i brots arreu (85, 86, 327).

Per altra banda, a part de l'estudi de l'evolució dels genotips de HuNoV, també s'han estudiat altres característiques epidemiològiques dels brots, com són els àmbits en els quals s'han reportat. Les residències han estat els àmbits més afectats per l'aparició de brots de HuNoV a Catalunya durant el període 2017-2019, en pràcticament la meitat dels brots inclosos a l'article. En aquest àmbit els residents formen part d'un dels grups més susceptibles pel que fa a simptomatologia i amb un

sistema immunològic més envellit, factors que condicionen a períodes més llargs d'excreció i durada de la malaltia, i conseqüent ampliació de la durada del brot (206, 335). Altres àmbits on també s'hi combinen els elements d'una convivència activa entre un número elevat de membres com les residències o centres sociosanitaris són les escoles, guarderies, albergs o campaments. Entre ells també s'ha reportat la presència d'un nombre rellevant de brots, on factors com la falta d'higiene, ser àmbits recreacionals amb conseqüents esferes d'activitat major, i un sistema immunològic encara immadur en cas dels infants, representen components favorables per a la transmissió de HuNoV en aquests darrers àmbits (336, 337). Tant és així que els brots descrits en guarderies van comptar amb una durada mitjana significativament més llarga a la resta d'àmbits.

El tipus de transmissió p/p va ser el més freqüentment reportat en un 74% dels brots de HuNoV estudiats, en un 22% va ser l'origen alimentari, en un 3% la combinació entre origen alimentari i conseqüent transmissió p/p, i en un 1% l'origen hídric, destacant-se la seva baixa importància en països desenvolupats (191). Encara que la transmissió de HuNoV a través d'aliments sigui la més reportada com a origen dels brots ocasionats (296), en les institucions estudiades no ho ha estat així. Tanmateix, la transmissió a través d'aliments és la que ha presentat a l'estudi una taxa d'atac més elevada i significativa en comparació amb la p/p; possiblement a causa d'una exposició més directa a l'agent i d'una dosi infectiva més elevada, motius que es relacionen amb brots d'una magnitud major a la literatura (323, 338). Als albergs/campaments i hotels han estat els àmbits on s'ha descrit una associació entre els brots decretats i un tipus de transmissió vehiculitzada a través d'aliments, mostrant conseqüentment taxes d'atac superiors a la resta d'àmbits. A part d'una possible contaminació pròpia de l'aliment, també



és notablement d'importància la relació entre una falta d'higienització i la presència de manipuladors d'aliments que cursin amb l'excreció de HuNoV, que fins i tot essent asimptomàtics, poden transferir fàcilment partícules víriques als aliments, fet que pugui repercutir en una expansió més ràpida dels agents (339, 340).

No es van observar correlacions entre els diversos genotips identificats i el mode de transmissió, l'edat dels individus afectats i la durada del brot. D'entre ells, la taxa mitjana d'atac en brots causats per GII.2[P16] va ser significativament més elevada que en brots causats per GI.4[P4] i GII.4[P31] Sydney 2012, i la dels brots causats per GII.6[P7] també va ser major que la dels brots associats a GII.4[P31] Sydney 2012. Els motius que podrien facilitar una explicació són probablement una manca d'immunitat dels individus front als genotips diferents del GII.4, i que aquests genotips es van identificar principalment en brots transmesos pels aliments. Els genotips GII.2[P16] i GI.3[P3] es van associar significativament respecte els altres genotips als àmbits d'albergs/campaments, on la presència de nens o adults joves hi resulta habitual. Paral·lelament, 3 de cada 4 brots ocasionats pel genotip de la càpsida GII.4 (GII.4[P4] Sydney 2012, GII.4[P16] Sydney 2012 i GII.4[P31] Sydney 2012) es van reportar en residències concorregudes per una major presència d'ancians. A la literatura també es pot observar una associació del genotip GII.4 en àmbits com les residències (325, 326), a diferència del GI i els genotips de GII, sense incloure el GII.4, en d'altres àmbits com per exemple escoles o centres educatius (107). Alhora, estudis de diversitat entre genotips de HuNoV i la seva associació segons el grup d'edat afectat han constatat que en individus menors de 15 anys és on s'observa una major diversitat de genotips causants, fet que va disminuint amb l'edat a diferència d'una prevalença en augment pel genotip GII.4 i les persones d'edat més avançada (72, 343).

L'edat per si mateixa però, pot no explicar completament per què la majoria dels brots a les residències van ser causats pel genotip de la càpsida GII.4. Dins d'aquest genotip, un dels epítops del domini P2 de la proteïna VP1, conegut com a epítop D, presenta un dels llocs primaris d'unió i més exposats als anticossos durant la resposta immunitària conjuntament amb l'A, a part de modular també l'afinitat d'unió per a diversos tipus d'HBGA (344). Així, es vincula l'evolució d'aquest domini tant a la immunitat de l'hoste davant la infecció com amb la susceptibilitat a la infecció (330, 345, 346). La presència d'aquest factor de virulència en el genotip GII.4, conjuntament amb la incapacitat del sistema immunitari envellit de dur a terme respostes immunitàries robustes (347), podria afavorir la prevalença d'aquest genotip per sobre de la resta en les persones d'edat més avançada (296, 348).

Tanmateix, examinant altres característiques dels brots, les residències són l'únic àmbit en comparació amb les altres institucions de l'estudi que mostren una relació entre els brots declarats i els períodes més freds de l'any, característiques que s'han reunit en un 85% dels brots. A part de canvis en els patrons de comportament mencionats anteriorment, l'increment en el número d'infeccions respiratòries en mesos freds condiciona a un augment de l'activitat i recurrència als centres de salut per part dels convivents a les residències, augmentant el risc i la probabilitat de contraure infeccions nosocomials com HuNoV (341, 342). Aquestes conseqüències ajudarien a explicar perquè el principal mode transmissió dels brots en residències va ser de tipus p/p, reportat en un 90% dels brots, a diferència dels altres àmbits.

Ateses les dificultats i el risc d'infecció que suposa la recollida de femta o vòmit pel diagnòstic de casos, incloent els brots causats per HuNoV,

en el segon article d'aquesta tesi doctoral es va estudiar el potencial que tindria un diagnòstic alternatiu de la infecció a través de mostres de saliva, arran de publicacions a la literatura on s'hi descrivia la seva presència (218-220). Així, durant els brots de HuNoV estudiats a l'article I, a part de mostres de femta, en 25 d'ells també s'hi van recollir un total de 347 mostres de saliva, amb la conseqüent informació epidemiològica i clínica dels individus per determinar-ne el seu abast.

La presència de HuNoV a la saliva va ser significativament més alta en individus que presentaven símptomes respecte dels asimptomàtics, en concret en un 12.1% i 3.6% respectivament. Aquesta presència de HuNoV detectada a la saliva és en general més baixa que la reportada per Kirby *et al.* en un 24% dels rentats bucal dels individus positius per HuNoV (218). A part d'aquest resultat provinent d'una brot hospitalari l'autor també va estudiar-ne un de familiar, on en aquest cas, a la totalitat dels 6 membres de la família se'ls va identificar l'RNA de HuNoV a la cavitat oral, fins i tot havent passat entre 10-15 dies després de l'inici de símptomes en la totalitat. Així, la detecció de HuNoV en el rentat bucal del brot familiar va ser més exitosa que no pas en l'hospitalari, possiblement a causa de les diferències entre els temps de mostreig, emmagatzematge i processament de les mostres. Al nostre estudi, el temps entre l'inici dels símptomes i la recollida de les mostres va ser de  $4 \pm 3.4$  dies, passant a ser congelades fins al moment d'anàlisi. Malgrat la demora en la presa de mostres en alguns casos, no hi va haver diferències significatives entre la positivitat o no de la saliva per HuNoV. Tot i això, el temps d'emmagatzematge fins l'anàlisi i l'efecte dels components que formen part de la saliva podrien tenir un impacte negatiu sobre l'estabilitat de les partícules víriques, conjuntament amb la baixa concentració del virus a la majoria de les mostres de saliva analitzades.

Al seu torn, Zhuo *et al.* van analitzar un total de 738 hisops orals de nens amb símptomes de GEA d'origen etiològic divers. En 83 d'ells es va observar la presència de diversos tipus de virus entèrics, sense identificar cap altre agent (bacterià o paràsits) causant de GEA a la cavitat oral. AdV va ser el més identificat en 38 mostres, 22 ho van ser per HuNoV, seguit de 16 per RV, 5 per SaV i 4 per AstV. Conjuntament, l'autor constata una sensibilitat del mètode de detecció de patògens virals mitjançant hisops orals per la RTqPCR del 18% i una especificitat del 99% (219). Aquests resultats serien semblants als obtinguts en el nostre estudi, on el mètode a partir de mostres de saliva mitjançant l'anàlisi per la RTqPCR tindria una sensibilitat de l'11.5% i una especificitat del 95.1%, fent referència només a HuNoV. D'aquesta manera es conclou que les mostres de femta continuarien sent la mostra de referència pel diagnòstic de les infeccions causades per HuNoV.

Tots els brots de l'article II en els quals es va observar la presència de HuNoV en la saliva d'individus infectats van ser brots causats per GII. L'associació va ser molt clara, sobre tot tenint en compte que les proporcions dels genogrups causants dels 25 brots van ser semblants: 14 dels brots van correspondre a GII, 9 a GI i 2 tant a GI com a GII. Així, aquests percentatges s'eleva a un 17.9% dels individus simptomàtics i un 5.2% d'asimptomàtics respectivament si tenim en compte solament al GII. Atesa la baixa concentració de HuNoV a la saliva només s'hi va poder aïllar el genotip del virus en dos individus corresponents al GII.17[P17], essent també el genotip identificat a la femta. La resta de brots de GII on es van identificar mostres de saliva positives per HuNoV van correspondre als genotips GII.4[P31] Sydney 2012, GII.4[P16] Sydney 2012 i GII.2[P16], a diferència del GII.1[P33], possiblement a causa d'un nombre inferior de mostres analitzades essent el genotip causant d'un únic brot. A l'estudi de Kirby *et al.* es van genotipar ambdós brots,

corresponents també a GII (GII.3 i GII.4) (218), essent únicament en l'estudi de Zhuo *et al.* on es va detectar una mostra d'hisop oral positiva per GI (219). Aquestes diferències entre la presència d'ambdós genogrups a la saliva poden ser degudes a factors intrínsecs del virus, però part de les diferències observades al nostre estudi també poden ser causades per diferències en la sensibilitat de la RTqPCR, on la proporció d'individus amb femta negativa va ser estadísticament superior per GI que per GII.

Per altra banda, un 84% dels individus que va proporcionar una mostra de saliva també ho va fer de femta, d'aquesta manera es va poder dur a terme una comparació entre els nivells d'excreció de HuNoV en femtes seriades. El resultat va evidenciar un augment significatiu de la replicació en aquells individus que presentaven l'RNA de HuNoV a la saliva sobre els que n'eren negatius. Per tant, aquestes observacions constaten una excreció major de partícules víriques a la femta per part d'aquells individus positius per HuNoV a la saliva, posant de manifest diferències individuals en la facilitat de transmissió.

Mitjançant els informes clínics dels individus afectats es va examinar una possible associació entre els símptomes presentats pels individus i la presència de HuNoV a la saliva. D'entre ells, es van estudiar els símptomes més freqüents de GEA com el vòmit, diarrea, nàusea, dolor abdominal o febre, on per cap d'ells es van presentar diferències entre els individus positius en saliva respecte als que no ho eren. Aquest fet coincideix amb la hipòtesi que la simptomatologia no està associada amb un increment de la replicació viral, sinó amb el sistema immune de l'hoste i la resposta antiviral associada (140). Kirby *et al.* i Zhuo *et al.* puntualitzen una associació entre la detecció de HuNoV a la saliva i els individus que presenten vòmits, sobretot si aquest és recollit entre

les primeres 24h després de l'inici de símptomes, tot i que en cap cas va resultar ser significatiu (218, 219).

Altres factors estudiats com el sexe dels individus, la presa d'inhibidors de la bomba de protons estomacal o l'estat secretor tampoc van mostrar cap relació, a excepció de l'edat. Els individus >65 anys van mostrar una prevalença significativa d'RNA de HuNoV a la saliva superior en comparació amb els individus <65 anys, identificant-se com un clar factor de risc. A l'estudi, també s'han descrit quantitats de partícules víriques a la femta significativament més elevades en persones infectades per GI1 >65 anys, en comparació amb individus d'edat inferior, confirmant que la replicació viral és intrínsecament més alta en les persones grans (cal destacar que aquesta observació no va presentar-se per a individus infectats per GI). A més de mostrar un nivell més elevat de replicació viral, l'edat també s'ha identificat com un factor de risc per al reflux gastroesofàgic (349), motiu que probablement faciliti l'aparició de HuNoV a la saliva. Contràriament, no hi ha haver diferències significatives entre la durada dels símptomes entre els individus amb saliva positiva i negativa per HuNoV, malgrat que a la literatura és conegut que en persones d'edat avançada es prolongui el període d'excreció (13).

El mecanisme que hi hauria darrere de la detecció de HuNoV a la saliva quan l'individu afectat no mostra vòmits resulta desconegut. La presència de HuNoV en absència de vòmits previs es podria explicar per un reflux gastroesofàgic dels continguts gastrointestinals a la cavitat oral, i la conseqüent unió de les partícules a diversos tipus de receptors HBGA expressats a la cavitat oral. La propagació de HuNoV en el model de cultiu d'enteròcits intestinals humans indica que representen cèl·lules permissives per a la replicació viral (54), i l'intestí, es considera el lloc principal per la replicació. Tanmateix, encara no s'ha abordat si un baix

nivell de partícules víriques podria replicar en un petit subconjunt de cèl·lules epitelials especialitzades en el tracte gastrointestinal superior i/o la faringe de determinats individus. Com a dada d'interès, en dos estudis recents s'ha detectat la presència de HuNoV a la nasofaringe de l'11.4% (222) i del 14.7% (223) dels nens amb GEA. Esposito *et al.* van observar la presència de HuNoV en un 0.5% de les mostres de nens amb símptomes respiratoris recolzant la hipòtesi que la transmissió de HuNoV també es podria produir a través de les secrecions respiratòries (221), o si aquestes podrien precedir a les infeccions al sistema gastrointestinal. Diferències també provocades pel genotip i factors propis del virus, la presència d'immunoglobulines o una composició particular de la microbiota a la cavitat oral poden afegir-se en l'explicació de perquè no tots els individus afectats es mostren positius per HuNoV a la saliva.

En definitiva, la presència de HuNoV a la cavitat oral hauria pogut esdevenir un mètode més atractiu i alternatiu per al diagnòstic de la infecció, fent-lo més ràpid i menys invasiu, a part de poder-se implementar més fàcilment (350, 351); però les dades aportades en aquest segon article donen un suport clar al fet que les mostres de saliva no serien adequades. Malgrat això, les proves de saliva no invasives han estat validades com a enfocament útil per confirmar i detectar ràpidament la infecció per HuNoV mitjançant la detecció d'immunoglobulines A i immunoglobulines G específiques; actualment hi hauria sistemes en desenvolupament que permetrien discriminar entre G1 i 4 dels genotips més freqüents del GII (GII.2, GII.4, GII.6 i GII.17) mitjançant una mostra de saliva (352, 353). Aquests immunoassajos es podrien implementar fàcilment en estudis epidemiològics i en àmbits comunitaris, o durant l'aparició de brots per controlar-ne la transmissió i poder reduir l'abast total d'individus afectats.

No obstant, la presència de l'RNA de HuNoV a la saliva obre la porta a una possible transmissió del virus via oral-oral entre individus, contribuint a la propagació de la infecció, encara que les concentracions mitjanes de l'RNA del virus a la saliva semblin molt més baixes que les presents a les femtes o vòmits. Gràcies a la baixa dosi infecciosa descrita per HuNoV (16, 354, 355) les concentracions podrien ser prou altes com per infectar un nou hoste. Conjuntament, gràcies a la utilització de la tècnica PMA-RTqPCR de viabilitat es va confirmar una proporció elevada de virus amb càpsides intactes a la saliva, i per tant potencialment en estat de viabilitat i amb capacitat d'infecció.

La determinació del gen *FUT2* va mostrar que un 82.4% dels individus analitzats van ser secretors, percentatges semblants als reportats a la bibliografia entre la població caucàsica (110). A part de l'estudi de correlació entre el fenotip secretor o no secretor i la presència de HuNoV a la saliva, la determinació del gen *FUT2* també ens va permetre identificar 18 individus no secretors que excretaven HuNoV a la femta; amb la presentació de símptomes de GEA en tots ells a excepció d'un. Si bé s'ha documentat la infecció simptomàtica de HuNoV en individus no secretors pels genotips de la càpsida GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3, GII.6, GII.7, GII.4 Sydney 2012 i GII.17 (95, 125, 354), el nostre estudi confirma per primera vegada la infecció associada al genotip GI.4, a partir de l'obtenció de la seqüència a la femta dels individus infectats. In vitro però, sí que s'hauria ja documentat la unió del genotip GI.4 a HBGA d'individus no secretors (108), tot i que no havia estat corroborat en infeccions naturals.

D'altra part, també es va realitzar una comparació dels genotips més freqüents identificats a la femta i el percentatge global de no secretors que infectaven. Aquestes dades van mostrar que el percentatge de no



secretors entre els individus infectats pels genotips GI.4[P4] i GI.6[P11] va ser notablement més alt que la mitjana de no secretors entre la població. Concretament, aquest resultat indicaria que aquests genotips tenen capacitat per infectar tant secretors com no secretors, a diferència dels individus infectats pels genotips GI.4[P16] Sydney 2012, GI.4[P31] Sydney 2012 i GI.17[P17] on el percentatge de no secretors infectats va ser més baix; indicant contràriament la seva predisposició per individus secretors (127, 356).

Aquests dos estudis han proporcionat el coneixement sobre els genotips circulants entre la població catalana causants de brots de HuNoV i la seva evolució al llarg de 3 anys. Les dades epidemiològiques recollides durant la decretació dels brots de HuNoV han permès conèixer la relació entre els àmbits d'afectació, el tipus de transmissió, la durada dels brots i la taxa d'atac entre els individus exposats. L'estudi i vigilància dels brots de GEA per HuNoV permet conèixer les característiques del virus, on una vigilància prematura pot reduir-ne el número de casos, conjuntament amb l'aplicació de mesures que evoquin per un ràpid control i gestió dels brots ocasionats.

A part dels brots estudiats també s'ha aprofundit en l'anàlisi de la presència de HuNoV a la saliva dels individus afectats. Amb la consegüent informació clínica s'ha pogut dur a terme un estudi de correlació entre la simptomatologia i diverses característiques dels individus amb la presència del virus a la saliva.

### **Estudi de supervivència i inactivació vírica de HuNoV en amanides RTE**

Els HuNoV representen un patogen d'especial rellevància per a la indústria alimentària, essent el principal agent de naturalesa vírica que més casos de malaltia genera entre els consumidors. Els HuNoV poden contaminar fruites i verdures en qualsevol punt de la cadena de producció per contacte directe amb matèria fecal, ja sigui a través d'aigua contaminada o per no haver practicat una higiene adequada per part dels manipuladors. I tenint en compte la seva elevada persistència a l'ambient, les partícules víriques poden romandre relativament estables sota el seu processament i emmagatzematge fins a la ingesta (162). A part dels mol·luscs bivalves, les hortalisses i vegetals que formen part de les amanides representen una de les matrius alimentàries que resulta més rellevant com a vehicle de transmissió per HuNoV.

Escudero *et al.* mostren una reducció de la quantitat de cg de HuNoV GI i GII entre 1-1.5 Log<sub>10</sub> en amanides artificialment contaminades al cap d'un període 14 dies d'estudi, on l'emmagatzematge a 4°C n'afavoreix la seva persistència comparat amb una temperatura de 20°C. L'autor també va monitoritzar-ne la disminució de la infectivitat utilitzant MuNoV com a model. A 4°C, la reducció va ser de 1.5 Log<sub>10</sub> però a 22°C va ser superior, de 3.0 Log<sub>10</sub> (357). Per altra banda, un altre estudi que mostra la persistència de les partícules víriques en amanides és el de Lamhoujeb *et al.* amb unes reduccions en cg semblants de 1.5 Log<sub>10</sub> per HuNoV GII al cap de 10 dies a 7°C (fent ús d'un pretractament enzimàtic amb RNAses per permetre la discriminació de càpsides intactes, per tal de mimetitzar millor el seu comportament en absència d'un cultiu cel·lular robust per a HuNoV) (243).

Sota l'anterior premissa, el tercer article d'aquesta tesi es va focalitzar en l'estudi de diversos desinfectants com a opcions disponibles pels

consumidors, i per tant fàcilment aplicables domèsticament, per assegurar una reducció eficaç de partícules de HuNoV sobre amanides RTE en cas de contenir-ne la seva presència. Tots els agents desinfectats utilitzats en aquest article, l'hipoclorit de sodi (NaClO), el diòxid de clor (ClO<sub>2</sub>) i el PAA (CH<sub>3</sub>-COOOH) estan aprovats per la FDA (Food and Drug Administration) pel rentat de fruites i verdures (358).

A l'estudi, els resultats d'eliminació de HuNoV en les amanides RTE contaminades artificialment i rentades mitjançant aigua de l'aixeta durant 10 minuts en remull van reduir els títols virals d'RNA, tant per a HuNoV GI com per a GII en 1 Log<sub>10</sub>; disminució inclosa dins del rang també descrit per Baert *et al.* entre 0.69 i 1.29 Log<sub>10</sub> (266). Tot i no haver-se reportat les concentracions de clor lliure de l'aigua utilitzada en els rentats, aquesta oscil·laria al voltant de 0.2-2 ppm en aigua potable de l'aixeta, essent no suficient per la inactivació de HuNoV. Els genomes de HuNoV poden persistir fins més d'un mes en aigua de l'aixeta (359) i amb reduccions de la infectivitat assajades en MuNoV <1 Log<sub>10</sub> al cap de 28 dies (360, 361).

Seguidament, l'ús dels tres desinfectants provats van millorar significativament l'eliminació de HuNoV d'ambdós genogrups en comparació amb el rentat només amb aigua. Conjuntament l'hipoclorit de sodi en concentracions de 100 ppm i el PAA a 80 ppm durant 10 minuts van mostrar les eficiències d'eliminació més altes, afegint aproximadament 2 Log<sub>10</sub> de reducció. D'entre ells però, el PAA és el que va mostrar la major capacitat de desinfecció. Per la seva banda, el diòxid de clor va mostrar la menor capacitat de desinfecció, essent l'agent que menys va reduir la presència de HuNoV en les amanides RTE assajades. Per altra banda, no hi va haver cap diferència significativa

en l'eliminació observada per GI i GII, de manera que ambdós genotips serien igualment susceptibles a l'ús d'aquests agents.

Aquests resultats d'eliminació de HuNoV analitzats mitjançant la RTqPCR de viabilitat (PMA-RTqPCR) van ser superiors comparats amb altres estudis de desinfecció, publicats utilitzant tractaments de desinfecció semblants mesurats per la RTqPCR. Baert *et al.* van observar reduccions de 2.2 Log<sub>10</sub> en enciams durant 5 minuts amb una concentració de PAA de 250 ppm en aigua de l'aixeta, i de 0.8 Log<sub>10</sub> utilitzant una concentració de 80 ppm en MuNoV. També van assajar una concentració d'hipoclorit de sodi a 200 ppm en les mateixes condicions, mostrant una reducció d'entre 1.6-2.2 Log<sub>10</sub> (270). L'ús de l'hipoclorit de sodi va permetre assolir uns nivells semblants de desinfecció, però es veu influenciat per la presència de matèria orgànica, condició que afecta als nivells de clor lliure produït i la consegüent reducció de les partícules víriques (362). D'aquesta manera, s'ha de tenir en compte que l'aigua utilitzada no contingui una abundant presència de matèria orgànica procedent del camp o a causa d'un reciclatge excessiu de la mateixa, ja que pot tenir una influència sobre l'agent.

Fraisse *et al.* van utilitzar les concentracions de 15 ppm d'hipoclorit de sodi durant 2 minuts i van constatar que la reducció entre MuNoV i FCV, dos dels virus model que permeten estudiar la infectivitat de HuNoV, mostrava reduccions molt diferents en enciams. Aquests estudis també realitzats sobre vegetals van permetre inactivar 2.9 Log<sub>10</sub> per FCV i 1.4 Log<sub>10</sub> per MuNoV. L'autor també va assajar-ho amb PAA a 100 ppm, biocida que també va resultar ser més efectiu que l'hipoclorit de sodi reduint 2.4 Log<sub>10</sub> per MuNoV i 3.2 Log<sub>10</sub> per FCV (275). Considerant que MuNoV seria un virus model més adequat per mimetitzar el comportament de HuNoV que FCV (363), Girard *et al.* van assajar durant

1 minut concentracions de 50 ppm d'hipoclorit de sodi, 20 ppm de diòxid de clor i 85 ppm de PAA sobre MuNoV. Els resultats van tornar a evidenciar una major reducció de la infectivitat per PAA superior a 2 Log<sub>10</sub>, mentre que pels altres compostos va ser inferior a 1 Log<sub>10</sub> (276).

En comparació amb els resultats de l'article, s'han obtingut reduccions més elevades que les observades a la bibliografia, principalment explicades per un temps d'exposició més llarg de fins a 10 minuts. A més, el nostre estudi afegeix la utilització de la PMA-RTqPCR per mesurar únicament les concentracions corresponents a virus amb càpsides intactes, i per tant, potencialment infecciosos, la qual cosa podria haver contribuït a la detecció de reduccions logarítmiques superiors.

La reducció de la infectivitat o del número de partícules víriques en els estudis anteriors es deu al dany que els compostos esmentats poden ocasionar tant al genoma de les partícules víriques, com a proteïnes de la càpsida implicades en l'estructura física. Tant l'hipoclorit de sodi, PAA i diòxid de clor actuen produint radicals oxidants que ataquen els components cel·lulars com lípids i proteïnes de la càpsida, on canvis en la seva conformació afecten tant a l'estabilitat de les partícules com a la capacitat d'unir-se als receptors de membrana de la cèl·lula hoste. Altrament, si el material genètic es veu afectat suficientment, el virus no podria replicar-se tot i que aconseguís entrar a la cèl·lula hoste (364).

Tanmateix, tot i que les dades no puguin confirmar completament una discriminació completa de les partícules víriques en estat no infeccioses a causa dels danys estructurals pels tractaments, es mostra que l'hipoclorit de sodi a 100 ppm o el PAA a 80 ppm poden garantir una completa eliminació de HuNoV en mostres d'amanida mixta si el virus està present en nombres inferiors a 3 Log<sub>10</sub>. Tot i això, és necessari poder recopilar dades suficients de la càrrega viral de HuNoV en productes alimentaris

contaminats, ja que només sota aquesta premissa, esdevindria possible poder avaluar si aquest nivell d'eliminació obtingut es pot considerar un objectiu virucida segur en termes de mitigació del risc.

Una part important dels procediments industrials que s'utilitzen per a la desinfecció de verdures o amanides preparades per tal de disminuir significament la càrrega microbiana inclou un rentat amb aigua complementada amb clor, la qual cosa també contribueix a preservar la qualitat de l'aigua que s'utilitza en el rentat. En cas de la utilització de l'hipoclorit de sodi, el procés és dut a terme normalment en una concentració entre 50-200 ppm durant 1-2 minuts i en un pH de l'aigua de rentat entre 6 i 7.5 (365). Aquest reactiu representa un dels biocides més utilitzats per a rentar productes frescos perquè mostra avantatges pel seu baix cost, facilitat en el seu ús i per tenir un gran poder oxidant (366). Tanmateix, també està subjecte a una disminució de la seva eficàcia atès que el clor és sensible al pH per sota de 6.0, a temperatures altes, on a part de generar males olors s'evaporarà i no estarà disponible per a la desinfecció; i a certa quantitat de la matèria orgànica (364).

Al seu torn, el diòxid de clor ha despertat un interès creixent durant els darrers anys en la indústria de productes frescos, a causa dels seus diversos avantatges inclosa l'eficàcia en un ampli rang de pH, menor reactivitat amb la matèria orgànica i una alta efectivitat a baixes concentracions (367, 368). Tot i això, a l'estudi és el desinfectant que hauria eliminat menys partícules de HuNoV i un compost no tan examinat a la bibliografia en productes frescos com el PAA o l'hipoclorit de sodi.

No obstant, el clor és altament corrosiu per a les superfícies d'acer inoxidable que s'utilitzen freqüentment, pot provocar un canvi de color als aliments si s'utilitza en concentracions més altes, i sobretot, n'és

rellevant el seu potencial generador de THM a les aigües residuals per la combinació amb d'altres productes químics. D'aquesta manera, en un futur pròxim pot resultar necessària una regulació en l'ús del clor com a agent de sanejament per tal de contribuir a una reducció en la contaminació d'aigües, i conseqüentment, a la utilització d'un altre agent que pugui respectar més el medi ambient i que mantingui l'efectivitat en la desinfecció sobre productes frescos com fruites i verdures (275).

Entre els candidats identificats per reemplaçar l'ús del clor hi ha els àcids peroxiacètics, incloent el PAA. Aquest compost ha mostrat ser eficaç contra agents vírics i bacterians, i alhora ser un compost més segur pels humans i menys contaminant pel medi ambient. L'àcid peracètic en combinació amb l'aigua dona lloc a la formació d'àcid acètic i peròxid d'hidrogen, on aquest últim representa un potent biocida molt utilitzat ja en la desinfecció, esterilització i antisèpsia. És també considerat un reactiu respectuós amb el medi ambient a diferència dels productes clorats, ja que es degrada ràpidament en productes innocus com aigua i oxigen (369). A diferència del clor, el PAA també manté la seva activitat a altes càrregues orgàniques, a pH entre 3 i 7.5 i a temperatures entre 0-40°C. Segons la FDA, els productes frescos rentats amb PAA no cal que es rentin amb aigua potable abans de poder vendre's, i en recomana que la seva concentració no n'excedeixi els 80 ppm (272, 357).

Les hortalisses i vegetals presents a les amanides representen un tipus d'aliments àmpliament consumits a tot el món, on la seva forma de menjar crua i una elevada manipulació durant la seva preparació, representen elements importants que faciliten la transmissió del virus. Per tant, un tractament de rentat adequat semblaria representar un pas

cabdal per a la reducció de les partícules víriques en la preparació dels aliments, assegurant quantitats lliures o molt reduïdes de HuNoV abans del seu consum (180, 187, 370, 371).

A l'article III, els resultats confirmen la idoneïtat de l'hipoclorit de sodi, i especialment del PAA, com a desinfectants per aplicar a la indústria alimentària, en combinació amb una gestió òptima dels perills i punts crítics d'higiene i control (APPCC). Atès que ambdós productes també es poden utilitzar potencialment a les llars, així com en serveis de càtering i restauració, la seva implantació com a productes químics desinfectants s'ha de reforçar en aquests entorns, per tal de mitigar el risc d'infeccions i brots per HuNoV.





# CONCLUSIONS



## Conclusions

Les conclusions generals extretes dels diferents estudis realitzats en aquesta Tesi Doctoral són:

- Les institucions tancades i semi-tancades més afectades per brots de HuNoV durant el període 2017-2019 van ser les residències, seguides d'estades en albergs/campaments i escoles.
- En els brots estudiats es van detectar 21 genotips diferents: 6 de GI (GI.1[P1], GI.3[P3], GI.3[P13], GI.4[P4], GI.5[P4], GI.6[P11]) i 15 de GII (GII.1[P33], GII.2[P16], GII.3[P21], GII.3[P30], GII.4[P4] Sydney 2012, GII.4[P16] Sydney 2012, GII.4[P31] Sydney 2012, GII.5[P40], GII.6[P7], GII.6[P7], GII.8[P8], GII.10[P16], GII.14[P7] i GII.17[P17]). D'entre ells, el genotip més prevalent va ser el GII.4[P31] Sydney 2012 en 14 dels brots, seguit de GII.4[P16] Sydney 2012 i GII.2[P16] en 12.
- Els genotips GI.4[P4], GII.2[P16], GII.4[P16] Sydney 2012, GII.4[P31] Sydney 2012 i GII.17[P17] es van detectar de manera consistent cada any, i d'ells, només el GII.2[P16] va mostrar una tendència negativa al llarg del temps.
- Mentre que el genotip GII.4 Sydney 2012 es va aïllar amb freqüència als brots que es van produir a les residències, els brots causats per GII.2[P16] i GI.3[P3] van ser a albergs/campaments.

- S'ha observat una associació major a l'estacionalitat durant l'època freda de l'any i l'aparició de brots causats per GI, a diferència de GII.
- La presència de HuNoV a la saliva va ser detectada en un 17.9% dels individus simptomàtics i un 5.2% d'asimptomàtics infectats pel GI.
- La detecció de HuNoV a la saliva no podria substituir a la femta com a mostra adequada pel diagnòstic de GEA per HuNoV, ja que el mètode presenta una baixa sensibilitat de l'11.5% i una especificitat del 95.1%.
- La presència de HuNoV a la saliva no es relaciona amb la presència d'una simptomatologia en concret, l'estat secretor, el sexe o la presa d'inhibidors de la bomba de protons, però sí que mostra una associació significativa per individus >65 anys, els quals també presenten nivells d'excreció en femta més elevats.
- S'obre la possibilitat a una transmissió oral-oral de HuNoV contribuint a la propagació de la infecció, gràcies a la detecció de partícules víriques intactes a la saliva dels individus afectats que podrien mantenir la capacitat d'infecció.
- Es confirma per primera vegada la infecció natural d'individus no secretors pel genotip GI.4.
- El percentatge d'individus no secretors infectats pels genotips GI.4[P4] i GI.6[P11] va ser notablement més alt que pels genotips

GII.4[P16] Sydney 2012, GII.4[P31] Sydney 2012 i GII.17[P17], indicant una predisposició superior d'aquests últims per individus secretors.

- L'ús de l'hipoclorit de sodi a 100 ppm o el PAA a 80 ppm durant 10 minuts després d'una esbandida inicial en aigua poden garantir una completa eliminació de HuNoV en mostres d'amanides RTE si el virus està present en nombres inferiors a 3 Log<sub>10</sub>.



# REFERÈNCIES





## Referències

1. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. 2009. Norovirus Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361(18):1776–85
2. Ahmed S, Hall A, Robinson A, Verhoef L, Premkumar P, Parashar U. 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 14(8):725–30
3. Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. 2016. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One.* 11(4):1–16
4. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Bonita E, et al. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* 200(5):802–12
5. Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, et al. 2014. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J. Clin. Virol.* 60(2):96–104
6. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28(1):134–64
7. Chen CJ, Wu FT, Huang YC, Chang WC, Wu HS, et al. 2015. Clinical and epidemiologic features of severe viral gastroenteritis in children: A 3-year surveillance, multicentered study in Taiwan with partial rotavirus immunization. *Med. (United States).* 94(33):e1372
8. Tian G, Jin M, Li H, Li Q, Wang J, Duan Z jun. 2014. Clinical

- characteristics and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Beijing, China in 2008-2009. *J. Med. Virol.* 86(7):1235-42
9. Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, Patel MM, Gastañaduy PA, et al. 2013. Norovirus disease in the united states. *Emerg. Infect. Dis.* 19(8):1198-1205
  10. Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. 1998. Molecular epidemiology of “norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 178(6):1571-78
  11. Roddie C, Paul JPV, Benjamin R, Gallimore CI, Xerry J, et al. 2009. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin. Infect. Dis.* 49(7):1061-68
  12. Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, et al. 2009. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24(3):1051-53
  13. Lai CC, Wang YH, Wu CY, Hung CH, Jiang DDS, Wu FT. 2013. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. *J. Clin. Virol.* 56(2):96-101
  14. Bok K, Green KY. 2012. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. *N. Engl. J. Med.* 367(22):2126-32
  15. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, et al. 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *J. Med. Virol.* 80(8):1468-76
  16. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, et al. 2014. Determination of the 50% human infectious dose for norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 209(7):1016-22

17. De Graaf M, Van Beek J, Koopmans MPG. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(7):421–33
18. European Food Safety Authority. 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16(12):5500
19. Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, Escobar D, Covián C, et al. 2020. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front. Immunol.* 11(961):1–14
20. Zahorsky J. 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 46:391–95
21. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J. Virol.* 10(5):1075–81
22. Adler J, Zickl R. 1969. Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.* 119(6):668–73
23. Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, et al. 1982. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 146(2):184–89
24. Vinjé J, Estes MK, Esteves P, Green KY, Katayama K, et al. 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J. Gen. Virol.* 100(11):1469–70
25. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. 2006. VPg of murine

- norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Viol. J.* 3(33):1-7
26. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. 1993. Sequence and genomic organization of norwalk virus. *Virology.* 195(1):51-61
  27. Thorne LG, Goodfellow IG. 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95:278-91
  28. Bailey D, Karakasiliotis I, Vashist S, Chung LMW, Reese J, et al. 2010. Functional Analysis of RNA Structures Present at the 3' Extremity of the Murine Norovirus Genome: the Variable Polypyrimidine Tract Plays a Role in Viral Virulence. *J. Virol.* 84(6):2859-70
  29. Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 36(8):2530-46
  30. Prasad B V, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* 68(8):5117-25
  31. Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science (80- ).* 286(5438):287-90
  32. Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, Estes MK. 2002. Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. *J. Virol.* 76(8):4044-55
  33. Choi JM, Hutson AM, Estes MK, Venkataram Prasad B V. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of

- histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(27):9175-80
34. Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BVV. 2006. X-ray structure of a native calicivirus: Structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(21):8048-53
  35. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparac-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. 2000. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J. Virol.* 74(14):6581-91
  36. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad B V., Estes MK. 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J. Virol.* 87(9):4818-25
  37. Sosnovtsev S V., Belliot G, Chang K-O, Prikhodko VG, Thackray LB, et al. 2006. Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *J. Virol.* 80(16):7816-31
  38. Liu BL, Viljoen GJ, Clarke IN, Lambden PR. 1999. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J. Gen. Virol.* 80(2):291-96
  39. Lateef Z, Gimenez G, Baker ES, Ward VK. 2017. Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. *BMC Genomics.* 18(1):1-16
  40. Li T, Hosmillo M, Schwanke H, Shu T, Wang Z, et al. 2018. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *J. Virol.* 92(5):1-18

41. Pfister T, Wimmer E. 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase. *J. Virol.* 75(4):1611-19
42. Sharp TM, Guix S, Katayama K, Crawford SE, Estes MK. 2010. Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One.* 5(10):1-15
43. Roth A, Karst S. 2016. Norovirus Mechanisms of Immune Antagonism. *Curr Opin Virol.* 16:24-30
44. Hillenbrand B, Günzel D, Richter JF, Höhne M, Schreier E, et al. 2010. Norovirus non-structural protein p20 leads to impaired restitution of epithelial defects by inhibition of actin cytoskeleton remodelling. *Scand. J. Gastroenterol.* 45(11):1307-19
45. Belliot G, Sosnovtsev S, Chang K, McPhie P, Green K. 2008. Nucleotidylation of the VPg Protein of a Human Norovirus by its Proteinase-Polymerase Precursor Protein. *Virology.* 374(1):33-49
46. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JWB, Hardy ME. 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 22(11):2852-59
47. Nakamura K, Someya Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, et al. 2005. A Norovirus Protease Structure Provides Insights into Active and Substrate Binding Site Integrity. *J. Virol.* 79(21):13685-93
48. Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. 2003. Processing of Norwalk virus

- nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology*. 308(2):216–24
49. Belliot G, Sosnovtsev S V., Chang K-O, Babu V, Uche U, et al. 2005. Norovirus Proteinase-Polymerase and Polymerase Are Both Active Forms of RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* 79(4):2393–2403
  50. Hosmillo M, Lu J, McAllaster MR, Eaglesham JB, Wang X, et al. 2019. Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation. *Elife*. 8:1–35
  51. Subba-Reddy C V., Goodfellow I, Kao CC. 2011. VPg-Primed RNA Synthesis of Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerases by Using a Novel Cell-Based Assay. *J. Virol.* 85(24):13027–37
  52. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11(7):1079–85
  53. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* 185(1):1335–37
  54. Ettayebi K, Hardy ME. 2003. Norwalk Virus Nonstructural Protein p48 Forms a Complex with the SNARE Regulator VAP-A and Prevents Cell Surface Expression of Vesicular Stomatitis Virus G Protein. *J. Virol.* 77(21):11790–97
  55. Martino B, Profio F, Melegari I, Sarchese V, Cafiero M, et al. 2016. A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infect Genet Evol.* 32:132–37
  56. Liu BL, Lambden PR, Günther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN.



1999. Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. *J. Virol.* 73(1):819–25
57. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MSJ, Vinjé J. 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 16(6):980–82
58. Shen Q, Zhang W, Yang S, Cui L, Hua X. 2012. Complete Genome Sequence of a New-Genotype Porcine Norovirus Isolated from Piglets with Diarrhea. *J. Virol.* 86(12):7015–16
59. de Graaf M, Bodewes R, van Elk CE, van de Bildt M, Getu S, et al. 2017. Norovirus infection in harbor porpoises. *Emerg. Infect. Dis.* 23(1):87–91
60. Teng JLL, Martelli P, Chan WM, Lee HH, Hui SW, et al. 2018. Two novel noroviruses and a novel norovirus genogroup in California sea lions. *J. Gen. Virol.* 99(6):772–82
61. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, et al. 2016. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J.* 10(3):609–20
62. Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 33(1):64–71
63. Green SM, Lambden PR, Owen Caul E, Ashley CR, Clarke IN. 1995. Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res.* 37(3):271–83
64. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe

- SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 346(2):312-23
65. Pang X. 2017. Detection and Laboratory Diagnosis of Noroviruses. In *The Norovirus: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. 1:109-29
66. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, et al. 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158(10):2059-68
67. Fu J, Bao C, Huo X, Hu J, Shi C, et al. 2019. Increasing Recombinant Strains Emerged in Norovirus Outbreaks in Jiangsu, China: 2015-2018. *Sci. Rep.* 9(1):2015-18
68. Eden J-S, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. 2013. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. *J. Virol.* 87(11):6270-82
69. van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, et al. 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* 18(5):545-53
70. ICTV. 2020. *Virus taxonomy: norovirus genus*. ICTV Report. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/caliciviridae/1167/genus-norovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/caliciviridae/1167/genus-norovirus)
71. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC-W, Green K, et al. 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* 100(10):1393-1406
72. Mans J, Murray TY, Nadan S, Netshikweta R, Page NA, Taylor MB. 2016. Norovirus diversity in children with gastroenteritis in South

- Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate. *Epidemiol. Infect.* 144(5):907–16
73. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Peñaranda S, et al. 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 51(2):121–25
74. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswo ME, Castro CJ, et al. 2017. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 55(7):2208–21
75. Barclay L, Park G, Vega E, Hall A, Parashar U, et al. 2014. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 20(8):731–40
76. De Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, et al. 2018. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro. J. Clin. Microbiol. Infect.* 20(26):1–12
77. Chen SY, Chiu CH. 2012. Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection. *Paediatr. Int. Child Health.* 32(3):128–31
78. Vinjé J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 53(2):373–81
79. Chan MCW, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, et al. 2015. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat. Commun.* 6:1–6
80. Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, et al. 2015. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 21(7):1240–42
81. Chan MCW, Hu Y, Chen H, Podkolzin AT, Zaytseva E V., et al.

2017. Global spread of norovirus gii.17 kawasaki 308, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.* 23(8):1354–59
82. Parikh MP, Vandekar S, Moore C, Thomas L, Britt N, et al. 2020. Temporal and Genotypic Associations of Sporadic Norovirus Gastroenteritis and Reported Norovirus Outbreaks in Middle Tennessee, 2012-2016. *Clin. Infect. Dis.* 71(9):2398–2404
83. Shen W, Sheng Y, Weng J, Li G, Wang D, et al. 2020. Molecular epidemiology of norovirus associated with acute gastroenteritis in Taizhou, China: A retrospective study. *J. Infect. Public Health.* 13(1):34–39
84. Ao Y yun, Yu J mei, Li L li, Jin M, Duan Z jun. 2014. Detection of human norovirus GIV.1 in China: A case report. *J. Clin. Virol.* 61(2):298–301
85. Hasing ME, Lee BE, Qiu Y, Xia M, Pabbaraju K, et al. 2019. Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012-2018. *BMC Infect. Dis.* 19(1):1–9
86. Niendorf S, Faber M, Tröger A, Hackler J, Jacobsen S. 2020. Diversity of noroviruses throughout outbreaks in Germany 2018. *Viruses.* 12(10):1–13
87. Van Beek J, De Graaf M, Xia M, Jiang X, Vinjé J, et al. 2016. Comparison of norovirus genogroup I, II and IV seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006. *J. Gen. Virol.* 97(9):2255–64
88. Rouhani S, Peñataro Yori P, Paredes Olortegui M, Sigvas Salas M, Rengifo Trigos D, Mondal D. 2016. Norovirus infection and

- acquired immunity in 8 countries: Results from the MAL-ED study. *Clin. Infect. Dis.* 62(10):1210-17
89. Arias A, Thorne L, Ghurburrun E, Bailey D, Goodfellow I. 2016. Norovirus Polymerase Fidelity Contributes to Viral Transmission In Vivo. *mSphere*. 1(5):1-11
  90. Ruis C, Roy S, Brown JR, Allen DJ, Goldstein RA, Breuer J. 2017. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One*. 12(6):1-9
  91. Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-hübinger AM, Hofmann J, et al. 2017. Niendorf 2016 Steep rise in norovirus cases and emergence of a new GII.P16\_GII.2. *Euro Surveill*. 22(4):1-4
  92. Eden J, Hewitt J, Lee K, Boni MF, Merif J. 2014. Europe PMC Funders Group The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology*. 0:106-13
  93. Allen DJ, Trainor E, Callaghan A, O'Brien SJ, Cunliffe NA, Iturriza-Gómara M. 2016. Early detection of epidemic GII-4 norovirus strains in UK and Malawi: Role of surveillance of sporadic acute gastroenteritis in anticipating global epidemics. *PLoS One*. 11(4):1-10
  94. Cortes-Penfield N, Ramani S, Estes MK, Atmar R. 2017. Prospects and Challenges in the development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther*. 39(8):1537-49
  95. Nordgren J, Svensson L. 2019. Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. *Viruses*. 11(3):1-19

96. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, et al. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9(5):548-53
97. Hutson AM, Airaud F, LePendou J, Estes MK, Atmar RL. 2005. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J. Med. Virol.* 77(1):116-20
98. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. 1990. Multiple-challenge study of host susceptibility to norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis.* 161(1):18-21
99. Mallagaray A, Creutzmacher R, Dülfer J, Mayer PHO, Grimm LL, et al. 2019. A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding. *Nat. Commun.* 10(1320):1-14
100. Kindberg E, Åkerlind B, Johnsen C, Knudsen JD, Heltberg O, et al. 2007. Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 45(8):2720-22
101. Almand EA, Moore MD, Jaykus LA. 2017. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Front. Microbiol.* 8(2549):1-10
102. Taube S, Mallagaray A, Peters T. 2018. Norovirus, glycans and attachment. *Curr. Opin. Virol.* 31:33-42
103. Tan M, Jiang X. 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: An answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 13(6):285-93
104. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, et al. 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens,

- a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 83(7):565-73
105. Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, et al. 2007. Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus. *J. Virol.* 81(11):5949-57
  106. Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoën-Clouet N, et al. 2003. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: Identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J. Infect. Dis.* 188(1):19-31
  107. de Graaf M, Villabruna N, Koopmans MP. 2017. Capturing norovirus transmission. *Curr. Opin. Virol.* 22:64-70
  108. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, et al. 2008. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. *J. Virol.* 82(21):10756-67
  109. Lopman BA, Trivedi T, Vicuña Y, Costantini V, Collins N, et al. 2015. Norovirus infection and disease in an ecuadorian birth cohort: Association of certain norovirus genotypes with host FUT2 secretor status. *J. Infect. Dis.* 211(11):1813-21
  110. Bucarado F, Kindberg E, Paniagua M, Vildevall M, L S. 2009. Genetic Susceptibility to Symptomatic Norovirus Infection in Nicaragua. *J Med Virol.* 81:728-35
  111. Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. 2006. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin. Immunol.* 18(6):375-86
  112. Kindberg E, Svensson L. 2009. Genetic basis of host resistance to norovirus infection. *Future Virol.* 4(4):369-82

113. Chang J, Yang T, Liu T, Lin T, Hu C, et al. 1999. Molecular analysis of secretor type  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene mutations in the Chinese and Thai populations. *Immunohematology*. 39:1013-17
114. Thorven M, Grahn A, Hedlund K-O, Johansson H, Wahlfrid C, et al. 2005. A Homozygous Nonsense Mutation (428G→A) in the Human Secretor (FUT2) Gene Provides Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII) Infections. *J. Virol.* 79(24):15351-55
115. Tan M, Jin M, Xie H, Duan Z, Jiang X. 2008. Outbreak Studies of a GII-3 and a GII-4 Norovirus Revealed an Association Between HBGA Phenotypes and Viral Infection. *J. Med. Virol.* 80:1296-1301
116. Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, et al. 2005. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns. *J. Virol.* 79(11):6714-22
117. Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinjé J. 2009. Herd Immunity to GII.4 Noroviruses Is Supported by Outbreak Patient Sera. *J. Virol.* 83(11):5363-74
118. Nordgren J, Kindberg E, Lindgren PE, Matussek A, Svensson L. 2010. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 16(1):81-87
119. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, et al. 2002. Norwalk Virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 122(7):1967-77



120. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. 2002. Binding of Norwalk Virus-Like Particles to ABH Histo-Blood Group Antigens Is Blocked by Antisera from Infected Human Volunteers or Experimentally Vaccinated Mice. *J. Virol.* 76(23):12335–43
121. Shanker S, Czako R, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK, Prasad BV V. 2014. Structural Analysis of Determinants of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in Genogroup I Noroviruses. *J. Virol.* 88(11):6168–80
122. Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, et al. 2012. Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. *J. Virol.* 86(20):11138–50
123. Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hedge RS, et al. 2009. Conservation of carbohydrate binding interfaces - Evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One.* 4(4):1–14
124. Rydell GE, Kindberg E, Larson G, Svensson L. 2011. Susceptibility to winter vomiting disease: A sweet matter. *Rev. Med. Virol.* 21(6):370–82
125. Currier RL, Payne DC, Staat MA, Selvarangan R, Shirley SH, et al. 2015. Innate susceptibility to norovirus infections influenced by FUT2 genotype in a United States pediatric population. *Clin. Infect. Dis.* 60(11):1631–38
126. de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, et al. 2011. Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens. *J. Virol.* 85(9):4057–70
127. Zhang XF, Huang Q, Long Y, Jiang X, Zhang T, et al. 2015. An

- outbreak caused by GII.17 norovirus with a wide spectrum of HBGA-associated susceptibility. *Sci. Rep.* 5(17687):1-10
128. Nordgren J, Sharma S, Kambhampati A, Lopman B, Svensson L. 2016. Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection. *PLoS Pathog.* 12(4):13-17
129. Ayouni S, Estienney M, Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K, de Rougemont A, et al. 2015. Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(9):874.e8
130. Liu P, Wang X, Lee JC, Teunis P, Hu S, et al. 2014. Genetic susceptibility to norovirus GII.3 and GII.4 infections in Chinese pediatric diarrheal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 33(11):e305-9
131. Van Trang N, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. 2014. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in vietnamese children. *J. Clin. Microbiol.* 52(5):1366-74
132. King JR, Varadé J, Hammarström L. 2019. Fucosyltransferase Gene Polymorphisms and Lewisb-Negative Status Are Frequent in Swedish Newborns, With Implications for Infectious Disease Susceptibility and Personalized Medicine. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 8(6):507-18
133. Larsson MM, Rydell GEP, Grahn A, Rodríguez-Díaz J, Åkerlind B, et al. 2006. Antibody prevalence and titer to norovirus (Genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J. Infect. Dis.* 194(10):1422-27
134. Wu SC, Arthur CM, Wang J, Verkerke H, Josephson CD, et al.

2021. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain preferentially recognizes blood group A. *Blood Adv.* 5(5):1305–9
135. Ryzhikov AB, Onkhonova GS, Imatdinov IR, Gavrilova E V., Maksyutov RA, et al. 2021. Recombinant SARS-CoV-2 S Protein Binds to Glycans of the Lactosamine Family in vitro. *Biochem.* 86(3):243–47
136. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. 2003. Norwalk Virus-Like Particle Hemagglutination by Binding to H Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 77(1):405–15
137. Medeiros GF, Mendes A, Castro RAB, Baú EC, Nader HB, Dietrich CP. 2000. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1475(3):287–94
138. Rostand KS, Esko JD. 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.* 65(1):1–8
139. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. 2004. Genogroup II Noroviruses Efficiently Bind to Heparan Sulfate Proteoglycan Associated with the Cellular Membrane. *J. Virol.* 78(8):3817–26
140. Newman KL, Leon JS. 2016. Norovirus immunology: Of mice and mechanisms. *Eur J Immunol.* 45(10):2742–57
141. Olofsson S, Bergström T. 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med.* 37(3):154–72
142. Han L, Tan M, Xia M, Kitova EN, Jiang X, Klassen JS. 2014. Gangliosides are ligands for human noroviruses. *J. Am. Chem.*

- Soc.* 136(36):12631–37
143. Wegener H, Mallagaray Á, Schöne T, Peters T, Lockhauserbäumer J, et al. 2017. Human norovirus GII.4(MI001) P dimer binds fucosylated and sialylated carbohydrates. *Glycobiology*. 27(11):1027–37
  144. Weichert S, Koromyslova A, Singh BK, Hansman S, Jennewein S, et al. 2016. Structural Basis for Norovirus Inhibition by Human Milk Oligosaccharides. *J. Virol.* 90(9):4843–48
  145. Ruvoën-Clouet N, Mas E, Marionneau S, Guillon P, Lombardo D, Pendu J Le. 2006. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of “secretor” mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem. J.* 393(3):627–34
  146. Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, et al. 2004. Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J. Infect. Dis.* 190(10):1850–59
  147. Shang J, Piskarev VE, Xia M, Huang P, Jiang X, et al. 2013. Identifying human milk glycans that inhibit norovirus binding using surface plasmon resonance. *Glycobiology*. 23(12):1491–98
  148. Miura T, Sano D, Suenaga A, Yoshimura T, Fuzawa M, et al. 2013. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J. Virol.* 87(17):9441–51
  149. Almand EA, Moore MD, Outlaw J, Jaykus LA. 2017. Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. *PLoS One*. 12(3):1–13

150. Rubio-del-Campo A, Coll-Marqués JM, Yebra MJ, Buesa J, Pérez-Martínez G, et al. 2014. Noroviral P-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. *PLoS One*. 9(2):21–25
151. Gandhi KM, Mandrell RE, Tian P. 2010. Binding of virus-like particles of norwalk virus to romaine lettuce veins. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(24):7997–8003
152. Esseili MA, Wang Q, Saif LJ. 2012. Binding of Human GII.4 Norovirus Virus-Like Particles to Carbohydrates of Romaine Lettuce Leaf Cell Wall Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(3):786–94
153. Tian P, Bates AH, Jensen HM, Mandrell RE. 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(6):645–51
154. Tian P, Engelbrektson AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: A possible mechanism of bioaccumulation. *J. Food Prot.* 70(9):2140–47
155. Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y. 2010. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *J. Hosp. Infect.* 75(1):42–46
156. Krumkamp R, Sarpong N, Schwarz NG, Adelkofer J, Loag W, et al. 2015. Gastrointestinal Infections and Diarrheal Disease in Ghanaian Infants and Children: An Outpatient Case-Control Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(3):1–14

157. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. 2004. Norovirus disease: Changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12(6):279–87
158. Kirby A, Shi J, Montes J, Lichtenstein M, Moe C, L. C. 2014. Disease Course and Viral Shedding in Experimental Norwalk Virus and Snow Mountain Virus Infection. *J. Med. Virol.* 86:2055–64
159. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, et al. 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14(10):1553–57
160. Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinjé J. 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr. Opin. Virol.* 2(1):96–102
161. Hall AJ. 2012. Noroviruses: The Perfect Human Pathogens? *J Infect Dis.* 205(11):1622–24
162. Cook N, Knight A, Richards GP. 2016. Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: A Critical Review. *J. Food Prot.* 79(7):1273–94
163. Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, et al. 2010. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: Improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am. J. Epidemiol.* 171(9):1014–22
164. Karsten C, Baumgarte S, Friedrich AW, Von Eiff C, Becker K, et al. 2009. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28(8):935–43
165. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. 2011. Risk factors

- for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol. Infect.* 139(11):1676–86
166. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect.* 124(3):481–87
167. Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, Ahmed SM, Lake R, et al. 2015. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21(4):592–99
168. McLaws ML. 2015. The relationship between hand hygiene and health care-associated infection: It's complicated. *Infect. Drug Resist.* 8:7–18
169. Park GW, Williamson KJ, Debess E, Cieslak PR, Gregoricus N, et al. 2018. High Hand Contamination Rates during Norovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 39(2):219–21
170. Hardstaff JL, Clough HE, Lutje V, McIntyre KM, Harris JP, et al. 2018. Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 15(10):589–97
171. Bozkurt H, Phan-Thien KY, van Ogtrop F, Bell T, McConchie R. 2021. Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis a virus contamination in berries: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61(1):116–38
172. Thornley CN, Hewitt J, Perumal L, Van Gessel SM, Wong J, et al. 2013. Multiple outbreaks of a novel norovirus GII.4 linked to an infected post-symptomatic food handler. *Epidemiol. Infect.* 141(8):1585–97

173. Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, et al. 2016. Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings. *J. Clin. Virol.* 82:119–25
174. World Health Organization. 2015. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. 1–255 pp.
175. European Food Safety Authority. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19(2):6406
176. Hall AJ, Eisenbart VG, Etingüe AL, Gould LH, Lopman BA, Parashar UD. 2012. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 18(10):1566–73
177. Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Söderberg K, Vasickova P, et al. 2017. Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food Environ. Virol.* 9(1):72–78
178. Woods JW, Calci KR, Marchant-Tambone JG, Burkhardt W. 2016. Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. *Food Microbiol.* 59:76–84
179. Henigman U, Biasizzo M, Vadnjal S, Toplak I, Gombač M, et al. 2015. Molecular characterisation of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. *New Microbiol.* 38(2):225–33
180. Guix S, Pintó RM, Bosch A. 2019. Final consumer options to control and prevent foodborne norovirus infections. *Viruses.* 11(4):1–23



181. Drouaz N, Schaeffer J, Farkas T, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2015. Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(15):5249-56
182. Pons W, Young I, Truong J, Jones-Bitton A, McEwen S, et al. 2015. A systematic review of waterborne disease outbreaks associated with small non-community drinking water systems in Canada and the United States. *PLoS One.* 10(10):1-17
183. Bouwknecht M, Verhaelen K, Rzezutka A, Kozyra I, Maunula L, et al. 2015. Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains. *Int. J. Food Microbiol.* 198:50-58
184. Callejón RM, Rodríguez-Naranjo MI, Ubeda C, Hornedo-Ortega R, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. 2015. Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(1):32-38
185. Purpari G, Macaluso G, Di Bella S, Gucciardi F, Mira F, et al. 2019. Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *Int. J. Infect. Dis.* 80:66-72
186. Losio MN, Pavoni E, Bilei S, Bertasi B, Bove D, et al. 2015. Microbiological survey of raw and ready-to-eat leafy green vegetables marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 210:88-91
187. Cook N, Williams L, D'Agostino M. 2019. Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Food Microbiol.* 79:85-89
188. Terio V, Bottaro M, Pavoni E, Losio MN, Serraino A, et al. 2017.

- Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 249:61–65
189. DiCaprio E, Culbertson D, Li J. 2015. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the roots of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(8):2727–34
190. Deboosere N, Pinon A, Caudrelier Y, Delobel A, Merle G, et al. 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol.* 32(1):48–56
191. Jones-Bitton A, Matthews J, Dickey B, Eisenberg J, Leon J. 2013. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect.* 141(8):1563–71
192. Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, et al. 2017. Norovirus in Bottled Water Associated with. *Emerg. Infect. Dis.* 23(9):1531–34
193. Allen DJ, Iturriza-Gómara M, Brown DWG. 2013. Advances in understanding of norovirus as a food- and waterborne pathogen and progress with vaccine development. In *Viruses in Food and Water*, pp. 319–48
194. Bosch A, Gkogka E, Le Guyader FS, Loisy-Hamon F, Lee A, et al. 2018. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 285:110–28
195. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* 58(1):42–49

196. Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, et al. 2008. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: Comparison of two pediatric wards over a winter season. *J. Clin. Microbiol.* 46(9):3112–15
197. Cheesbrough J, Barkess-Jones L, Brown D. 1997. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect.* 35(4):325–26
198. Rico E, Pérez C, Belver A, Sabaté S, Razquin E, et al. 2020. Norovirus detection in environmental samples in norovirus outbreaks in closed and semi-closed settings. *J. Hosp. Infect.* 105(1):3–9
199. Boxman ILA, Verhoef L, Hägele G, Klunder K, te Loeke NAJM, et al. 2015. Environmental testing for norovirus in various institutional settings using catering companies as sentinels for norovirus prevalence among the general population. *Food Control.* 47:98–102
200. Aron J, Hall D. 2011. Division of viral diseases, national center for immunization and respiratory diseases, CDC. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep.* 60(RR-3):1–18
201. Alsved M, Fraenkel CJ, Bohgard M, Widell A, Söderlund-Strand A, et al. 2020. Sources of airborne norovirus in hospital outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* 70(10):2023–28
202. Johnson DL, Mead KR, Lynch RA, Hirst DVL. 2013. Lifting the lid on toilet plume aerosol: A literature review with suggestions for future research. *Am. J. Infect. Control.* 41(3):254–58

203. Bonifait L, Charlebois R, Vimont A, Turgeon N, Veillette M, et al. 2015. Detection and Quantification of Airborne Norovirus during Outbreaks in Healthcare Facilities. *Clin. Infect. Dis.* 61(3):299-304
204. Nenonen NP, Hannoun C, Svensson L, Torén K, Andersson LM, et al. 2014. Norovirus GII.4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 52(7):2352-58
205. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44(1):1-8
206. Rajagopalan S, Yoshikawa TT. 2016. Norovirus Infections in Long-Term Care Facilities. *J. Am. Geriatr. Soc.* 64(5):1097-1103
207. Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, Lee LE, Biggs C, et al. 2016. Epidemiologic, virologic, and host genetic factors of norovirus outbreaks in long-term care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 62(1):1-10
208. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, et al. 2013. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin. Infect. Dis.* 57(4):e22-121
209. Belliot G, Lopman B, Ambert-Balay K, Pothier P. 2014. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection. *Clin Microbiol Infect.* 20(8):724-30
210. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. 2010. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol. Infect.* 138(10):1454-58

211. Qi R, Huang Y ting, Liu J wei, Sun Y, Sun X feng, et al. 2018. Global Prevalence of Asymptomatic Norovirus Infection: A Meta-analysis. *E Clin. Med.* 2:50–58
212. Huhti L, Szakal ED, Puustinen L, Salminen M, Huhtala H, et al. 2011. Norovirus GII-4 causes a more severe gastroenteritis than other noroviruses in young children. *J. Infect. Dis.* 203(10):1442–44
213. Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Kindberg E, Paniagua M, et al. 2010. Asymptomatic norovirus infections in nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29(10):934–39
214. Bucardo F, Reyes Y, Becker-Dreps S, Bowman N, Gruber JF, et al. 2017. Pediatric norovirus GII.4 infections in Nicaragua, 1999–2015. *Infect. Genet. Evol.* 55:305–12
215. Rockx BHG, Vennema H, Hoebe CJPA, Duizer E, Koopmans MPG. 2005. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J. Infect. Dis.* 191(5):749–54
216. García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko GP. 2006. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J. Clin. Microbiol.* 44(8):2997–3000
217. Teunis PFM, Sukhrie FHA, Vennema H, Bogerman J, Beersma MFC, Koopmans MPG. 2015. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol. Infect.* 143(8):1710–17
218. Kirby A, Dove W, Ashton L, Hopkins M, Cunliffe NA. 2010. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 48(4):285–87

219. Zhuo R, Parsons BD, Lee BE, Drews SJ, Chui L, et al. 2018. Identification of Enteric Viruses in Oral Swabs from Children with Acute Gastroenteritis. *J. Mol. Diagnostics*. 20(1):56–62
220. Cheng V. 2019. Detection of norovirus in air samples in a non-vomiting patient: implications of testing saliva for norovirus in an immunocompromised host. *J. Hosp. Infect.* 103(3):357–58
221. Esposito S, Daleno C, Scala A, Senatore L, Ascolese B, Principi N. 2014. Detection of norovirus in respiratory secretions in children with respiratory tract infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 33(3):314–16
222. Kweon OJ, Lim YK, Kim HR, Kim TH, Lee MK. 2018. Fecal respiratory viruses in acute viral respiratory infection and nasopharyngeal diarrheal viruses in acute viral gastroenteritis: Clinical impact of ectopic viruses is questionable. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28(3):465–72
223. Dábilla N, Nunes Vieira Almeida T, Carvalho Rebouças Oliveira A, Kipnis A, Neres Silva T, et al. 2017. Norovirus in feces and nasopharyngeal swab of children with and without acute gastroenteritis symptoms: First report of GI.5 in Brazil and GI.3 in nasopharyngeal swab. *J. Clin. Virol.* 87:60–66
224. Randazzo W, D'Souza DH, Sanchez G. 2018. Norovirus: The Burden of the Unknown. *Adv. Food Nutr. Res.* 86:13–53
225. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1548–57

226. Butot S, Putallaz T, Amoroso R, Sánchez G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(12):4155–61
227. Randazzo W, Sánchez G. 2020. Hepatitis A infections from food. *J. Appl. Microbiol.* 129(5):1120–32
228. Bellou M, Kokkinos P, Vantarakis A. 2013. Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. *Food Environ. Virol.* 5(1):13–23
229. Nasheri N, Vester A, Petronella N. 2019. Foodborne viral outbreaks associated with frozen produce. *Epidemiol. Infect.* 147:e291
230. ISO 15216-1:2017. Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 1: Method for Quantification; ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
231. ISO 15216-2:2019. Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR—Part 2: Method for Detection; ISO: Geneva, Switzerland, 2019
232. Lowther JA, Bosch A, Butot S, Ollivier J, Mäde D, et al. 2019. Validation of EN ISO method 15216 - Part 1 - Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* 288:82–90
233. Costantini V, Morantz EK, Browne H, Ettayebi K, Zeng XL, et al. 2018. Human norovirus replication in human intestinal enteroids as model to evaluate virus inactivation. *Emerg. Infect. Dis.* 24(8):1453–64
234. Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, De Graaf M, et

- al. 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nat. Protoc.* 10(12):1939–47
235. Manuel CS, Moore MD, Jaykus LA. 2018. Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. *Food Microbiol.* 76:337–45
236. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. 2007. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(16):5111–17
237. Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques.* 34(4):804–13
238. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods.* 67(2):310–20
239. Elizaquível P, Aznar R, Sánchez G. 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J. Appl. Microbiol.* 116(1):1–13
240. Lee M, Seo DJ, Seo J, Oh H, Jeon SB, et al. 2015. Detection of viable murine norovirus using the plaque assay and propidium-monoazide-combined real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 221:57–61
241. Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R, Sánchez G. 2016. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* 229:1–6



242. Randazzo W, Khezri M, Ollivier J, Le Guyader FS, Rodríguez-Díaz J, et al. 2018. Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples. *Int. J. Food Microbiol.* 266:1–7
243. Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J. 2008. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(11):3349–55
244. Dancho BA, Chen H, Kingsley DH. 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *Int. J. Food Microbiol.* 155(3):222–26
245. Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P. 2008. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(10):3315–18
246. Hirneisen KA, Kniel KE. 2013. Comparing human norovirus surrogates: Murine norovirus and tulane virus. *J. Food Prot.* 76(1):139–43
247. Knight A, Haines J, Stals A, Li D, Uyttendaele M, et al. 2016. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *Int. J. Food Microbiol.* 216:40–49
248. Fong T, Lipp EK. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):357–71
249. Pu J, Miura T, Kazama S, Konta Y, Azraini ND, et al. 2018. Weekly

- variations in norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 284:48–55
250. Schaeffer J, Treguier C, Piquet JC, Gachelin S, Cochenne-Laureau N, et al. 2018. Improving the efficacy of sewage treatment decreases norovirus contamination in oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 286:1–5
251. Meghnath K, Hasselback P, McCormick R, Prystajec N, Taylor M, et al. 2019. Outbreaks of norovirus and acute gastroenteritis associated with British Columbia oysters, 2016–2017. *Food Environ. Virol.* 11(2):138–48
252. Montazeri N, Maite M, Liu D, Cormier J, Landry M, et al. 2015. Surveillance of Enteric Viruses and Microbial Indicators in the Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) and Harvest Waters along Louisiana Gulf Coast. *J. Food Sci.* 80(5):M1075–82
253. Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM. 2000. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal- contaminated oysters harvested in Louisiana. *J. Infect. Dis.* 181(Suppl2):381–86
254. Passerat J, Ouattara NK, Mouchel JM, Vincent Rocher, Servais P. 2011. Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Res.* 45(2):893–903
255. Regulation (EC) 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying down Specific Rules for the Organisation of Official Controls on Products of Animal Origin Intended for Human Consumption
256. Rupnik A, Keaveney S, Devilly L, Butler F, Doré W. 2018. The

- Impact of Winter Relocation and Depuration on Norovirus Concentrations in Pacific Oysters Harvested from a Commercial Production Site. *Food Environ. Virol.* 10(3):288-96
257. McLeod C, Polo D, Le Saux JC, Le Guyader FS. 2017. Depuration and Relaying: A Review on Potential Removal of Norovirus from Oysters. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16(4):692-706
258. Borchardt MA, Bradbury KR, Alexander EC, Kolberg RJ, Alexander SC, et al. 2011. Norovirus Outbreak Caused by a New Septic System in a Dolomite Aquifer. *Ground Water.* 49(1):85-97
259. Jovanović Galović A, Bijelović S, Milošević V, Hrnjaković Cvjetković I, Popović M, et al. 2016. Testing for viral material in water of public bathing areas of the Danube during summer, Vojvodina, Serbia, 2014. *Eurosurveillance.* 21(15):2013-20
260. Codex Alimentarius Commission. 2012. Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Viruses in Food. *CAC*, pp. 46-63
261. Mormann S, Dabisch M, Becker B. 2010. Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of Norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2):536-45
262. Campos CJA, Lees DN. 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(12):3552-61
263. European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads).

*EFSA J.* 12(3):3600

264. European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries). *EFSA J.* 12(6):3706
265. Verhaelen K, Bouwknecht M, Rutjes SA, de Roda Husman AM. 2013. Persistence of human norovirus in reconstituted pesticides - Pesticide application as a possible source of viruses in fresh produce chains. *Int. J. Food Microbiol.* 160(3):323–28
266. Bae JY, Lee JS, Shin MH, Lee SH, Hwang IG. 2011. Effect of wash treatments on reducing human norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. *J. Food Prot.* 74(11):1908–11
267. Butot S, Putallaz T, Sánchez G. 2008. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 126(1–2):30–35
268. Mattison K, Harlow J, Morton V, Cook A, Pollari F, et al. 2010. Enteric viruses in ready-to-eat packaged leafy greens. *Emerg Infect.* 16:1815–17
269. Zhou Z, Zuber S, Cantergiani F, Butot S, Li D, et al. 2017. Inactivation of viruses and bacteria on strawberries using a levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate based sanitizer, taking sensorial and chemical food safety aspects into account. *Int. J. Food Microbiol.* 257:176–82
270. Baert L, Vandekinderen I, Devlieghere F, Van EC, Debevere J, Uyttendaele M. 2009. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* 0157:H7 on shredded

- iceberg lettuce and in residual wash water. *J. Food Prot.* 72(5):1047-54
271. Dunkin N, Coulter C, Weng SC, Jacangelo JG, Schwab KJ. 2019. Effects of pH Variability on Peracetic Acid Reduction of Human Norovirus GI, GII RNA, and Infectivity Plus RNA Reduction of Selected Surrogates. *Food Environ. Virol.* 11(1):76-89
272. Fuzawa M, Bai H, Shisler J, Nguyen T. 2020. The Basis of Peracetic Acid Inactivation Mechanisms for Rotavirus and Tulane Virus under Conditions Relevant for. *Appl. Environ. Microbiol.* 86(19):1-17
273. Vimont A, Fliss I, Jean J. 2015. Study of the Virucidal Potential of Organic Peroxyacids Against Norovirus on Food-Contact Surfaces. *Food Environ. Virol.* 7(1):49-57
274. Allwood PB, Malik YS, Hedberg CW, Goyal SM. 2004. Effect of temperature and sanitizers on the survival of feline calicivirus, Escherichia coli, and F-specific coliphage MS2 on leafy salad vegetables. *J. Food Prot.* 67(7):1451-56
275. Fraisse A, Temmam S, Deboosere N, Guillier L, Delobel A, et al. 2011. Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 151(1):98-104
276. Girard M, Mattison K, Fliss I, Jean J. 2016. Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* 219:7-11
277. World Health Organization. 2009. *WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care.* 1-270 pp.

- 
278. Liu P, Escudero B, Jaykus LA, Montes J, Goulter RM, et al. 2013. Laboratory evidence of Norwalk virus contamination on the hands of infected individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(24):7875–81
279. Sharps CP, Kotwal G, Cannon JL. 2012. Human norovirus transfer to stainless steel and small fruits during handling. *J. Food Prot.* 75(8):1437–46
280. Liu P, Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C. 2010. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2):394–99
281. Tuladhar E, Hazeleger WC, Koopmans M, Zwietering MH, Duizer E, Beumer RR. 2015. Reducing viral contamination from finger pads: Handwashing is more effective than alcohol-based hand disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 90(3):226–34
282. Vogel L. 2011. Hand sanitizers may increase norovirus risk. *Can Med Assoc J.* 183(12):E799–800
283. Australian Government Department of Health and Ageing. 2010. Guidelines for the public health management of gastroenteritis outbreaks due to norovirus or suspected viral agents in Australia.
284. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep.* 60(RR-3):1–18
285. Health Protection Agency. 2012. Guidelines for the management of norovirus outbreaks in acute and community health and social care settings
286. European Food Safety Authority. 2011. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control

- of foodborne viruses. *EFSA J.* 9(7):2190
287. Stals A, Uyttendaele M, Baert L, Van Coillie E. 2013. Norovirus transfer between foods and food contact materials. *J. Food Prot.* 76(7):1202–9
288. Lemm D, Merettig N, Lucassen R, Bockmühl DP. 2014. Inactivation of human norovirus by common domestic laundry procedures. *Tenside Surfactants Deterg.* 51(4):304–6
289. European Food Safety Authority. 2015. Evaluation of heat treatments, different from those currently established in the EU legislation, that could be applied to live bivalve molluscs from B and C production areas, that have not been submitted to purification or relaying, in order to eliminate. *EFSA J.* 13(12):4332
290. European Food Safety Authority. 2012. Scientific opinion on norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J.* 10(1):2500
291. Agència Catalana de Seguretat Alimentària. 2016. *ACSA Brief: Riscos Emergents: Norovirus.* [https://acsa.gencat.cat/web/.content/Documents/eines\\_i\\_recursos/acsaBrief/acsabrief\\_norovirus\\_enero16.pdf](https://acsa.gencat.cat/web/.content/Documents/eines_i_recursos/acsaBrief/acsabrief_norovirus_enero16.pdf)
292. Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, White PA. 2019. Norovirus antivirals: Where are we now? *Med. Res. Rev.* 39(3):860–86
293. Giersing B, Vekemans J, Nava S, Kaslow D, Moorthy V. 2019. Report from the World Health Organization’s third Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 8–10th June 2016. *Vaccine.* 37:7315–27
294. O’Brien SJ, Donaldson AL, Iturriza-Gomara M, Tam CC. 2016. Age-

- Specific Incidence Rates for Norovirus in the Community and Presenting to Primary Healthcare Facilities in the United Kingdom. *J. Infect. Dis.* 213(Suppl 1):S15-18
295. Aliabadi N, Lopman BA, Parashar UD, Hall AJ, Branch E, Team VG. 2015. Development and Implementation in Potential Target Populations. *Expert Rev Vaccines.* 14(9):1241-53
296. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 52(1):147-55
297. Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, Johnson JA, Lepore CJ, et al. 2017. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog.* 13(1):1-22
298. Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, Green KY, Virgin HW. 2015. Advances in Norovirus Biology. *Cell Host Microbe.* 15(6):668-80
299. Richardson C, Bargatze RF, Goodwin R, Mendelman PM. 2013. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev. Vaccines.* 12(2):155-67
300. Fang H, Tan M, Xia M, Wang L, Jiang X. 2013. Norovirus P Particle Efficiently Elicits Innate, Humoral and Cellular Immunity. *PLoS One.* 8(4):e63269
301. Esposito S, Principi N. 2020. Norovirus Vaccine: Priorities for Future Research and Development. *Front. Immunol.* 11(1383):1-9
302. Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, et al. 2011. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 17(8):1381-88



303. Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, Evans MR, et al. 2012. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): Incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*. 61(1):69–77
304. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, et al. 2013. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, Circa 2006. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(7):639–48
305. Verhoef L, Koopmans M, Van Pelt W, Duizer E, Haagsma J, et al. 2013. The estimated disease burden of norovirus in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 141(3):496–506
306. Cardemil C, Parashar U, Hall A. 2017. Norovirus infection in older adults epidemiology, risk factors, and opportunities for prevention and control. *Infect Dis Clin North Am.* 31(4):839–70
307. Lindsay L, Wolter J, De Coster I, Van Damme P, Verstraeten T. 2015. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: A systematic review. *BMC Infect. Dis.* 15(425):1–16
308. Batz MB, Hoffmann S, Morris JG. 2012. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the united states using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J. Food Prot.* 75(7):1278–91
309. Rius C, Soldevila N, Guix S, Dominguez A. 2021. Norovirus in a Holiday Camp in Catalonia (Spain), 2017. *Viruses.* 13(1792):1–9
310. Parrón I, Álvarez J, Jané M, Cornejo Sánchez T, Razquin E, et al. 2019. A foodborne norovirus outbreak in a nursing home and

- spread to staff and their household contacts. *Epidemiol. Infect.* 147(e225):1-7
311. Parrón I, Barrabeig I, Alseda M, Cornejo-Sánchez T, Guix S, et al. 2020. Involvement of workers in closed and semiclosed institutions in outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus. *Viruses*. 12(1392):1-11
312. Parrón I, Barrabeig I, Alseda M, Rius C, Cornejo-Sánchez T, et al. 2021. Norovirus outbreaks in long-term care facilities in Catalonia from 2017 to 2018. *Sci. Rep.* 11(1):23218
313. Torner N, Izquierdo C, Coronas L, Martínez A, Rovira A, et al. 2021. Acute gastroenteritis outbreaks in closed and semi-closed facilities during 2017 in Catalonia, Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 40(5):1085-89
314. Doménech-Sánchez A, Laso E, Genestar E, Berrocal CI. 2021. Norovirus outbreak causing gastroenteritis in a hotel in Menorca, Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 39(1):22-24
315. Doménech-Sánchez A, Laso E, Pérez MJ, Berrocal CI. 2020. Efficient management of a norovirus outbreak causing gastroenteritis in two hotels in Spain, 2014. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 38(9):431-33
316. Albert-Hernández M, Martínez-Pino I, Antón-Rueda JE, Brezmes-Valdivieso MF. 2017. An outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a boarding school in Zamora, Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 35(4):264-65
317. Patterson T, Hutchings P, Palmer S. 1993. Outbreak of SRSV gastroenteritis at an international conference traced to food

- handled by a post-symptomatic caterer. *Epidemiol. Infect.* 111(1):157-62
318. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Updated Norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR.* 60:1-12
319. Becker KM, Moe CL, Southwick KL, MacCormack JN. 2000. Transmission of Norwalk Virus during a Football Game. *N. Engl. J. Med.* 343(17):1223-27
320. Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, et al. 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.* 151(3):261-69
321. Loutreul J, Cazeaux C, Levert D, Nicolas A, Vautier S, et al. 2014. Prevalence of Human Noroviruses in Frozen Marketed Shellfish, Red Fruits and Fresh Vegetables. *Food Environ. Virol.* 6(3):157-68
322. Rushton SP, Sanderson RA, Reid WDK, Shirley MDF, Harris JP, et al. 2019. Transmission routes of rare seasonal diseases: The case of norovirus infections. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374(1776):1-8
323. Matthews J, Dickey B, Miller R, Felzer J, Dawson B, et al. 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* 140(7):1161-72
324. Pringle K, Lopman B, Vega E, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. 2015. Noroviruses: Epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiol.* 10(1):53-67

325. Fu J, Ai J, Jin M, Jiang C, Zhang J, et al. 2015. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015. *Eurosurveillance*. 20(24):1-7
326. Hernandez JM, Silva LD, Sousa Junior EC, Cardoso JF, Reymão TKA, et al. 2020. Evolutionary and Molecular Analysis of Complete Genome Sequences of Norovirus From Brazil: Emerging Recombinant Strain GII.P16/GII.4. *Front. Microbiol.* 11(1870):1-10
327. Lun JH, Hewitt J, Yan GJH, Tuipulotu DE, Rawlinson WD, White PA. 2018. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 was the dominant norovirus identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses*. 10(10):1-16
328. Thanusuwanasak T, Puenpa J, Chuchaona W, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. 2018. Emergence of multiple norovirus strains in Thailand, 2015-2017. *Infect. Genet. Evol.* 61:108-12
329. Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Xerry J, Adigwe J, Gray JJ. 2007. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. *Arch. Virol.* 152(7):1295-1303
330. Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, Debbink K, Swann EW, et al. 2018. Antigenic Characterization of a Novel Recombinant GII.P16-GII.4 Sydney Norovirus Strain with Minor Sequence Variation Leading to Antibody Escape. *J. Infect. Dis.* 217(7):1145-52
331. Barclay L, Cannon JL, Wikswo ME, Phillips AR, Browne H, et al. 2019. Emerging novel GII.P16 noroviruses associated with multiple capsid genotypes. *Viruses*. 11(6):1-17

332. Domingo E, Diez J, Martinez MA, Herndndez J, Holguin A, et al. 1993. New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J Gen Virol.* 74(Pt 10):2039–45
333. Smith DB, McAllister J, Casino C, Simmonds P. 1997. Virus “quasispecies”: Making a mountain out of a molehill? *J. Gen. Virol.* 78(7):1511–19
334. Bull RA, White PA. 2011. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol.* 19(5):233–40
335. Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, et al. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46(9):2959–65
336. Mossong J, Hens N, Jit M, Beutels P, Auranen K, et al. 2008. Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med.* 5(3):0381–91
337. Kumazaki M, Usuku S. 2016. Norovirus genotype distribution in outbreaks of acute gastroenteritis among children and older people: An 8-year study. *BMC Infect. Dis.* 16(1):1–8
338. Noda M, Fukuda S, Nishio O. 2008. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 122(1–2):216–20
339. Franck KT, Lisby M, Fonager J, Schultz AC, Böttiger B, et al. 2015. Sources of calicivirus contamination in foodborne outbreaks in denmark, 2005-2011-the role of the asymptomatic food handler.

- J. Infect. Dis.* 211(4):563–70
340. Barrabeig I, Rovira A, Buesa J, Bartolomé R, Pintó R, et al. 2010. Foodborne norovirus outbreak: The role of an asymptomatic food handler. *BMC Infect. Dis.* 10(269):1–7
  341. Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DWG. 2003. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1):71–77
  342. Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, et al. 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.* 43(9):4659–64
  343. Hernandez JM, Silva LD, Junior ECS, Bandeira RS, Rodrigues EAM, et al. 2018. Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. *BMC Infect. Dis.* 18(1):1–10
  344. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, et al. 2012. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002705
  345. Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JL, Zheng DP, et al. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 5(2):0269–90
  346. Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, Yount B, Collins MH, et al. 2019. Human Norovirus Epitope D Plasticity Allows Escape from Antibody Immunity without Loss of Capacity for Binding Cellular Ligands. *J. Virol.* 93(2):e01813-18

347. Paulke-Korinek M, Kundi M, Laaber B, Brodtraeger N, Seidl-Friedrich C, et al. 2013. Factors associated with seroimmunity against tick borne encephalitis virus 10 years after booster vaccination. *Vaccine*. 31(9):1293-97
348. Mallory ML, Lindesmith LC, Graham RL, Baric RS. 2019. GI.4 human norovirus: Surveying the antigenic landscape. *Viruses*. 11(2):12-14
349. Richter JE, Rubenstein JH. 2018. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology*. 154(2):267-76
350. Wade TJ, Augustine SAJ, Griffin SM, Sams EA, Oshima KH, et al. 2018. Asymptomatic norovirus infection associated with swimming at a tropical beach: A prospective cohort study. *PLoS One*. 13(3):1-14
351. Pisanic N, Rahman A, Saha SK, Labrique AB, Nelson KE, et al. 2017. Development of an oral fluid immunoassay to assess past and recent hepatitis E virus (HEV) infection. *J Immunol Methods*. 448:1-8
352. Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, Lee LE, DeBess EE, et al. 2020. Humoral and Mucosal Immune Responses to Human Norovirus in the Elderly. *J. Infect. Dis*. 221(11):1864-74
353. Pisanic N, Ballard SB, Colquechagua FD, François R, Exum N, et al. 2019. Minimally Invasive Saliva Testing to Monitor Norovirus Infection in Community Settings. *J. Infect. Dis*. 219(8):1234-42
354. Guix S, Fuentes C, Pintó RM, Blanco A, Sabrià A, et al. 2020. Infectivity of norovirus GI and GI.4 from bottled mineral water during a waterborne outbreak, Spain. *Emerg. Infect. Dis*. 26(1):134-

37

355. Kirby AE, Teunis P, Moe CL. 2015. Two Human Challenge Studies Confirm High Infectivity of Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 211(1):166–67
356. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidón MF, et al. 2009. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS One.* 4(5):e5593
357. Kim Y, Kim A, Park I, SH C, Lee Y, et al. 2008. Study on the safety evaluation management system of disinfectants and sanitizers. *Safe Food.* 3:18–25
358. U.S. Food and Drug Administration. 2021. *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*
359. Ngazoa ES, Fliss I, Jean J. 2008. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 104(3):707–15
360. Fallahi S, Mattison K. 2011. Evaluation of murine norovirus persistence in environments relevant to food production and processing. *J. Food Prot.* 74(11):1847–51
361. Seitz SR, Leon JS, Schwab KJ, Lyon GM, Dowd M, et al. 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(19):6884–88
362. Gulati BR, Allwood PB, Hedberg CW, Goyal SM. 2001. Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *J. Food Prot.* 64(9):1430–34



363. Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. 2006. Surrogates for the study, of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 69(11):2761–65
364. Hirneisen KA, Black EP, Cascarino JL, Fino VR, Hoover DG, Kniel KE. 2010. Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9(1):3–20
365. Parish M, Beuchat L, Suslow T, Harris L, Garrett E, et al. 2003. Method to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2:161–73
366. Seymour IJ, Appleton H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 91(5):759–73
367. Tomás-Callejas A, López-Gálvez F, Sbodio A, Artés F, Artés-Hernández F, Suslow T V. 2012. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. *Food Control.* 23(2):325–32
368. Gordon G, Rosenblatt A. 2005. Chlorine dioxide: The current status of the art. *Ozone Sci. Eng.* 27(3):203–7
369. McDonell G, Russell AD. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(1):147–79
370. Hall A, Wikswo M, Pringle K, Gould L, Parashar U. 2014. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC. Vital signs: Foodborne norovirus outbreaks—United States, 2009–2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly.*

*Rep.* 63(22):491-95

371. European Centers for Disease Control and Prevention. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10(3):2597



# ANNEX



## Annex

Dins del projecte número 727580 del programa Horizon 2020 European Union en el qual s'inclou l'article III també es va participar en l'elaboració del següent article:

Møretro T, Nguyen-The C, Didier P, Maître I, Izsó T, Kasza G, Skuland SE, Cardoso MJ, Ferreira VB, Teixeira P, Borda D, Dumitrascu L, Neagu C, Nicolau AI, **Anfruns-Estrada E**, Foden M, Voysey P, Langsrud S. **“Consumer practices and prevalence of Campylobacter, Salmonella and norovirus in kitchens from six European countries”**. Int J Food Microbiol. 2021;347:109172. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109172.

La revista *International Journal of Food Microbiology* es troba al primer quartil en l'àrea de Food Science & Technology, amb un factor d'impacte de 5.277 a l'any 2020.

El doctorand ha dut a terme la part experimental i d'investigació del treball relacionada amb norovirus, així com l'anàlisi i interpretació dels resultats i escriptura d'aquesta part.

Directora i tutora



Dra. Susana Guix Arnau

Director



Dr. Albert Bosch Navarro

Barcelona, 2022



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmi](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmi) [cro](http://www.cro)

## Consumer practices and prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella* and norovirus in kitchens from six European countries

Trond Mørseth<sup>a,\*</sup>, Christophe Nguyen-The<sup>b</sup>, Perrine Didier<sup>b,c</sup>, Isabelle Maître<sup>c</sup>, Tekla Izsó<sup>d</sup>, Gyula Kasza<sup>d</sup>, Silje E. Skuland<sup>e</sup>, Maria João Cardoso<sup>f</sup>, Vania B. Ferreira<sup>f</sup>, Paula Teixeira<sup>f</sup>, Daniela Borda<sup>g</sup>, Loredana Dumitrascu<sup>g</sup>, Corina Neagu<sup>g</sup>, Anca Ioana Nicolau<sup>g</sup>, Eduard Anfruns-Estrada<sup>h</sup>, Mike Foden<sup>i</sup>, Phil Voysey<sup>j</sup>, Solveig Langsrud<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nofima, Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, N-1430 Ås, Norway

<sup>b</sup> INRAE, Avignon Université, UMR SOPOV, 84000 Avignon, France

<sup>c</sup> ESA, USC1422 GRAPPE, Ecole Supérieure d'Agricultures (ESA), INRAE, SFR 4207 QUASAV, 55 rue Rabelais, BP 30748, 49007 Angers Cedex, France

<sup>d</sup> NFCSO, National Food Chain Safety Office, H-1024 Keleti Károly u. 24., Budapest, Hungary

<sup>e</sup> Consumption Research Norway (SIFO), Oslo Metropolitan University, Oslo, Norway

<sup>f</sup> Universidade Católica Portuguesa, CBOF - Centro de Biotecnologia e Química Fina - Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Rua Diogo Botelho 1327, 4169-005 Porto, Portugal

<sup>g</sup> Dunarea de Jos University of Galati, Faculty of Food Science and Engineering, Domneasă Street 111, 800201, Galati, Romania

<sup>h</sup> Enteric Virus Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

<sup>i</sup> Keele University, Staffordshire, United Kingdom

<sup>j</sup> Campden BRI, Chipping Campden, Gloucestershire GL55 6LD, UK

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Kitchen hygiene  
Consumer  
Campylobacter  
Salmonella  
Norovirus  
Cross-contamination  
Poultry  
Chicken

## ABSTRACT

About 40% of foodborne infections are acquired in the home. The aim of the present study was to track contamination of pathogens during domestic food preparation and link the contamination to preparation practices. Research participants from 87 households in six European countries were observed and interviewed during shopping and preparation of a chicken and vegetable meal. The presence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and norovirus on raw chicken, kitchen surfaces, cloths and sponges was determined.

The prevalence of *Campylobacter* on raw chicken varied from 8.3% in Norway (NO) to 80% in France (FR) and Portugal (PT), with a mean prevalence of 57%. *Campylobacter* was found on half of the products that had been frozen and appeared to be less prevalent on chicken from supermarkets than other sources. *Salmonella* was found in 8.6% of raw chicken samples, exclusively from Hungary (HU).

A relationship between observed practices and spread of pathogens to kitchen surfaces was found only for the use of cutting boards for chicken and/or vegetables. After food preparation, *Campylobacter* and *Salmonella* were isolated from 23% (samples derived from HU, RO, UK) and 8.7% (HU), respectively of cutting boards. Research participants in France and Portugal were more likely to buy products that fitted their recipe, with less need for using cutting boards. Using the same board and knife for vegetables after using it for chicken and without washing with detergent was common in Portugal and Romania, but not in the other countries. Contamination with *Campylobacter* to other kitchen surfaces or washing utensils were found in five households (UK, RO, PT). Rinsing chicken in sinks was common in three countries (PT, HU, RO), and washing vegetables in the same sink was also usual. Prevalence of Norovirus was low, with detection in one out of 451 samples. The participants' awareness of the risk posed by pathogens from raw chicken differed among the six countries, with higher awareness in Norway and the UK than the other countries studied.

In conclusion, practices intended to avoid cross-contamination from chicken to kitchen surfaces and washing utensils are not established among consumers in all European countries. Nevertheless, cross-contamination events that disseminate infectious doses of pathogens seems to be rare, probably due to the relatively low levels of pathogens in food combined with food preferences. Food safety interventions must consider the national food culture, preferences, practices and the prevalence and levels of pathogens in food. Emphasis should be on

\* Corresponding author.

E-mail address: [trond.moretro@nofima.no](mailto:trond.moretro@nofima.no) (T. Mørseth).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109172>

Received 25 November 2020; Received in revised form 17 March 2021; Accepted 18 March 2021

Available online 26 March 2021

0168-1605/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> ).

A continuació es detallen altres publicacions no incloses en aquesta tesi, però que van ser realitzades durant el curs del doctorat.

- Guix S, Fuentes C, Pintó RM, Blanco A, Sabrià A, **Anfruns-Estrada E**, Rodríguez-Garrido V, Alonso M, Bartolomé R, Cornejo T, Pumarola T, Bosch A. **Infectivity of Norovirus GI and GII from Bottled Mineral Water during a Waterborne Outbreak, Spain.** *Emerg Infect Dis.* 2020;26(1):134-137. doi:10.3201/eid2601.190778.

La revista *Emerging Infectious Diseases* es troba al primer quartil en l'àrea Infectious Diseases amb un factor d'impacte de 6.883 l'any 2020.

- Moreno T, Pintó RM, Bosch A, Moreno N, Alastuey A, Minguillón MC, **Anfruns-Estrada E**, Guix S, Fuentes C, Buonanno G, Stabile L, Morawska L, Querol X. **Tracing surface and airborne SARS-CoV-2 RNA inside public buses and subway trains.** *Environ Int.* 2021;147:106326. doi:10.1016/j.envint.2020.106326.

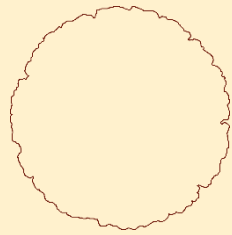
La revista *Environment International* es troba al primer quartil en l'àrea Environmental Sciences amb un factor d'impacte de 9.621 l'any 2020.



- Chavarria-Miró G, **Anfruns-Estrada E**, Martínez-Velázquez A, Vázquez-Portero M, Guix S, Paraira M, Galofré B, Sánchez G, Pintó RM, Bosch A. **Time Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wastewater during the First Pandemic Wave of COVID-19 in the Metropolitan Area of Barcelona, Spain.** *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(7): e02750-20 doi: 10.1128/AEM.02750-20.

La revista *Applied and Environmental Microbiology* es troba al primer quartil en l'àrea Biotechnology & Applied Microbiology amb un factor d'impacte de 4.792 l'any 2020.





Barcelona, 2022