



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Infecciones por norovirus

Juan Manuel Ribes Fernández^a y Javier Buesa Gómez^{a,b,*}

^aDepartamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^bServicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Valencia, España

RESUMEN

Palabras clave:

Norovirus
Calicivirus humanos
Gastroenteritis
Diarrea
Diagnóstico

Los norovirus infectan a personas de todas las edades, causando con frecuencia brotes epidémicos de gastroenteritis aguda, además de casos esporádicos. La aplicación de métodos moleculares en el diagnóstico de estas infecciones está permitiendo conocer su impacto real. La epidemiología molecular ha facilitado, además, la identificación de los genotipos que más frecuentemente infectan a la población. A pesar de que la gastroenteritis causada por norovirus es generalmente leve y de corta duración, la enfermedad puede llegar a ser grave, especialmente en los ancianos, y puede cronificarse en los pacientes inmunodeprimidos. Se han identificado factores de susceptibilidad a la infección por norovirus constituidos por grupos de antígenos histosanguíneos (ABO, Lewis y secretor) que están implicados en la unión de dichos virus a los enterocitos. Existe un gran polimorfismo genético en la expresión de estos antígenos en los seres humanos, lo cual, junto a la diversidad genética de los norovirus, hace que la interrelación entre estos virus y sus hospedadores humanos sea compleja. El diagnóstico no se suele realizar todavía de forma habitual en muchos laboratorios, aunque aquellos que participan en estudios de vigilancia epidemiológica han detectado la circulación de cepas de norovirus que evolucionan de forma secuencial a lo largo del tiempo, de forma similar a lo que sucede con los virus gripales.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Norovirus infections

ABSTRACT

Keywords:

Norovirus
Human calicivirus
Gastroenteritis
Diarrhea
Diagnosis

Noroviruses infect persons of all ages, often causing epidemic outbreaks of acute gastroenteritis as well as sporadic cases. The application of novel molecular methods to the diagnosis of norovirus infections is now revealing their real impact. Molecular epidemiology studies have identified the most common viral genotypes responsible for human infections. Norovirus gastroenteritis is usually mild and of short duration, although the disease can also be severe, especially in the elderly, or may become chronic, as occurred in the immunocompromised patients. Several factors have been identified regarding the differential susceptibility to norovirus infection among individuals, consisting of several histo-blood antigens (ABO, Lewis and secretor) that are involved in the binding process of noroviruses to the enterocytes. The expression of these antigens in humans is genetically encoded, and shows a high polymorphism, which combined with the genetic diversity of noroviruses, makes the virus-host relationship rather complex. The diagnosis of norovirus infections is not performed routinely in many laboratories, but those involved in epidemiological surveillance have identified norovirus strains that evolve sequentially over time, similarly to Influenza viruses.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La gastroenteritis es una enfermedad muy frecuente que afecta a personas de cualquier edad. La Organización Mundial de la Salud considera que, anualmente, se producen 1,8 millones de fallecimientos por gastroenteritis en niños menores de 5 años en todo el mundo¹. La etiología de la gastroenteritis aguda puede ser muy diversa, incluyendo bacterias, parásitos y virus. Se calcula que en un 40-50% de los casos la causa queda sin identificar², aunque la detección de

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: javier.buesa@uv.es (J. Buesa Gómez).

virus entéricos mediante métodos moleculares está reduciendo estos porcentajes de casos con etiología no filiada. Actualmente se considera que una de las principales causas de gastroenteritis en personas de todas las edades son los calicivirus humanos, que incluyen a los géneros *Norovirus* y *Sapovirus*³. Se calcula que, en Estados Unidos, más del 90% de los brotes epidémicos de gastroenteritis son atribuibles a norovirus⁴.

La infección por norovirus se caracteriza por una diarrea autolimitada acompañada por náuseas, vómitos y dolor abdominal. En 1972, Kapikian et al⁵ descubrieron, mediante microscopía electrónica, un virus en las heces de un brote de gastroenteritis en una escuela primaria en Norwalk (Ohio, Estados Unidos)⁵. Observaron unas partículas víricas pequeñas y de aspecto redondeado, a las que denominaron virus Norwalk, que actualmente está considerado como el prototipo del género *Norovirus*. Este género pertenece a la familia *Caliciviridae* junto con los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus*, y se ha propuesto la inclusión del género *Nebovirus*⁶.

Los norovirus son virus pequeños, con un diámetro aproximado de 38 nm, no envueltos e icosaédricos. Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple y sentido positivo, de un tamaño aproximado de 7,5 kb, que contiene tres pautas abiertas de lectura que codifican los genes no estructurales y estructurales. No se han conseguido aislar ni cultivar norovirus humanos en cultivos celulares, y tampoco se dispone de un modelo animal, lo que dificulta su estudio. El descubrimiento de un norovirus murino⁷, capaz de replicar en cultivos celulares y de infectar ratones, ha supuesto un avance indudable en el conocimiento de este género de virus, pero no constituye un modelo experimental de la patogenia de los norovirus humanos. Las técnicas de biología molecular han permitido mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos de replicación y del impacto real de la enfermedad. Uno de los avances más importantes lo constituyó en 1990 la clonación del genoma del virus Norwalk, ya que permitió aplicar las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (PCR-TR) y de secuenciación al estudio de estos virus, además de expresar *in vitro* proteínas víricas en sistemas de expresión en procariotas y eucariotas. Basándose en estas técnicas, se han clasificado los norovirus en cinco genogrupos con 29 genotipos o *clusters*⁸. Las cepas que infectan a los seres humanos pertenecen a los genogrupos I, II y IV, mientras que a los genogrupos III y V pertenecen las cepas que infectan a los animales (tabla 1). Las cepas dentro de un genotipo se pueden subdividir en variantes según las secuencias y los análisis filogenéticos, como sucede con el genotipo GII.4.

Otro de los grandes avances en la investigación de los norovirus lo constituye la expresión de la proteína de la cápside en sistemas de expresión de proteínas, como en baculovirus o en el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Esta proteína se autoensambla en partículas pseudovíricas o VLP (del inglés *virus-like particles*) con morfología y antigenicidad similares a las del virión infectivo. Las VLP expresadas mediante estos sistemas se han utilizado para producir antígenos y determinar la respuesta de anticuerpos. También se han empleado como inmunógenos, con el fin de inmunizar animales y obtener sueros o anticuerpos monoclonales que reconozcan la partícula viral. Por último, las VLP han servido para estudiar las interacciones entre las células susceptibles y el virus.

Sintomatología clínica

El período de incubación de una infección por norovirus es, generalmente, de 24-48 h. La enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%)⁹. Los vómitos son muy frecuentes en los niños mayores de 1 año, mientras que en los lactantes se suele desarrollar sólo diarrea¹⁰. Estos síntomas pueden persistir en pacientes hospitalizados y en niños menores de 11 años, entre 4 y 6 días. Se han descrito casos graves asociados a

Tabla 1
Genogrupos, genotipos y cepas de referencia de norovirus^a

Genogrupo	Genotipo	Virus de referencia
I	1	Norwalk/68/US
I	2	Southampton/91/UK
I	3	Desert Shield/395/90/SA
I	4	Chiba 407/87/JJP
I	5	Musgrove/89/UK
I	6	Hesse 3/97/GE
I	7	Winchester/94/UK
I	8	Boxer/02/US
II	1	Hawaii/71/US
II	2	Melksham/94/UK
II	3	Toronto 24/91/CA
II	4	Bristol/93/UK
II	5	Hillingdon/90/UK
II	6	Seacroft/90/UK
II	7	Leeds/90/UK
II	8	Amsterdam/98/NL
II	9	VABeach/01/US
II	10	Erfurt/U01/DE
II	11	SW918/01/JJP
II	12	Wortley/R00/UK
II	13	Fayetteville/02/US
II	14	M7/03/US
II	15	J23/02/US
II	16	Tiffin/03/US
II	17	CS-E1/03/US
III	1	BoJena/98/DE
IV	2	BoCH126/00/NL
IV	1	Alphatron/98/NL
V	1	MNV-1

^aClasificación según Zheng et al⁸.

enterocolitis necrosante¹¹ y fallecimientos de pacientes de edad avanzada en brotes en residencias de ancianos¹². La gravedad de la enfermedad, comparada con la diarrea por rotavirus, parece ser ligeramente menor en estudios basados en pacientes extrahospitalarios, mientras que, en niños hospitalizados, posee una gravedad similar¹³. Se ha descrito la persistencia de infección con síntomas durante más de 1 año en pacientes pediátricos oncológicos¹⁴ y en adultos inmunodeprimidos¹⁵.

Patogenia

El estudio de los mecanismos moleculares de la patogenia y de la inmunidad está limitado por la ausencia de un modelo animal y por la incapacidad de los norovirus de replicar *in vitro*. En estudios con voluntarios infectados llama la atención que, aproximadamente, el 13-40% de los voluntarios no se infectan, y únicamente un 50% desarrollan la enfermedad^{16,17}. Estas observaciones hicieron sospechar que la susceptibilidad del hospedador es importante en el desarrollo de la enfermedad por norovirus. Se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histosanguíneo (HBGA, del inglés *histo-blood group antigens*) específicos, que actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores susceptibles¹⁸. La combinación de la unión específica de cada cepa de norovirus a receptores HBGA específicos y la expresión variable de los mismos puede explicar la distinta susceptibilidad a la infección, tanto en el contexto de brotes como en voluntarios sanos¹⁷.

Los norovirus se unen a los receptores celulares a través de un dominio específico de la proteína de la cápside. Ésta posee dos dominios funcionales: el dominio S (la porción interna de la cápside) y el dominio P (la porción protuberante). El dominio P se divide en los subdominios P1 (el enlace entre el interior y la región P2) y P2 (que se une al receptor celular y es la región más externa de la cápside). La secuencia génica que codifica P2 es la región más variable del genoma de norovirus y expresa determinantes de su unión al receptor y epítotos reconocidos por anticuerpos¹⁹.

Documento descargado de <http://www.elsevier.es> el 24/09/2010. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Los receptores HBGA son una familia compleja de glucanos presentes en la superficie de células sanguíneas, en los epitelios intestinales y respiratorios, y en secreciones biológicas, como la saliva y la leche. La expresión de HBGA está regulada por varios genes que determinan la vía biosintética específica que establece los fenotipos ABO, Lewis y secretor. La presencia o la ausencia de alelos de los genes FUT1, FUT2 y FUT3, que codifican las enzimas que glucosilan de forma secuencial distintos precursores, determinan si un individuo es susceptible a la infección por una cepa determinada de norovirus. El estado denominado "secretor" depende de la expresión del gen que codifica la enzima α -1,2-fucosiltransferasa (FUT2) y determina la susceptibilidad a las infecciones por norovirus. Las personas que son "no secretoras" (20% de los europeos) son resistentes a la infección por el virus Norwalk (GI.1)¹⁸. Se ha observado que algunas cepas de norovirus infectan sólo a un conjunto de la población humana y se han identificado ocho patrones distintos de HBGA que permiten la unión a muy diversos genotipos de norovirus dentro de los genogrupos GI y GII, lo que hace posible que prácticamente todos los individuos sean susceptibles a la infección por alguna cepa de norovirus. Aunque parece que los HBGA son esenciales para la infección, pueden existir otros receptores adicionales, o los norovirus podrían unirse a otros hidratos de carbono no identificados todavía²⁰.

El estudio de los mecanismos evolutivos de persistencia de norovirus se ha realizado con el genotipo GII.4, porque es el predominante a nivel mundial en los últimos 20 años. Se ha propuesto que el genotipo GII.4 sufre un proceso de evolución secuencial, similar al que ocurre con los virus gripales²¹. La mayor parte de las variaciones ocurren cerca del dominio de unión al receptor y consisten en cambios de aminoácidos en la región P2 y en zonas adyacentes de la región P1²¹. Estos cambios permitirían a los virus escapar del reconocimiento por los anticuerpos y originarían nuevos patrones de unión a los receptores HBGA^{21,22}.

Inmunidad

Los estudios realizados con voluntarios demostraron que los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección, aunque de corta duración, de entre 6 y 14 semanas^{17,23}. Contrariamente a lo esperado, estos estudios también demostraron que los individuos con títulos más elevados de anticuerpos séricos o de coproanticuerpos tenían más probabilidad de infectarse con el virus que las personas con concentraciones bajas de anticuerpos. Este hecho se explica porque las personas sin anticuerpos frente a una cepa determinada de norovirus no son genéticamente susceptibles a ella. También se observó que individuos que fueron sintomáticos podían reinfectarse cuando se les volvía a inocular norovirus 27-42 meses más tarde¹⁷. A pesar de estos resultados, estos mismos estudios con voluntarios y otros trabajos sugieren que se desarrolla, al menos, una protección parcial frente a infecciones posteriores por norovirus, como es el caso de algún estudio de cohortes en comunidades²⁴.

Diagnóstico

Hasta 1993, el único método disponible para diagnosticar las infecciones por norovirus fue la microscopía electrónica. Una vez conocida la secuencia nucleotídica de su genoma, la PCR-TR se ha convertido en la técnica de referencia para su diagnóstico, lo que nos permite detectar norovirus en muestras clínicas y ambientales, en agua y alimentos. Esta técnica, junto a la secuenciación de los amplificadores, es particularmente útil en los estudios epidemiológicos para descubrir el origen de un brote o para caracterizar cepas. Se han descrito múltiples cebadores para detectar secuencias genómicas de norovirus. En general, estos cebadores están diseñados para detectar el gen de la ARN-polimerasa viral (región A) o el gen de la cápside (región C). Dos cebadores comúnmente utilizados para identificar el

gen de la ARN-polimerasa son JV12Y (ATACCACTATGATGCAGAYTA) y JV131 (TCATCATCACCATAGAAIGAG)²⁵. La secuenciación de los amplificadores permite identificar el genotipo (GI.1-8 y GII.1-17) o el genogrupos (I o II) del aislado al comparar la secuencia con otras secuencias que han sido depositadas en bases de datos de norovirus, como la base europea disponible en <https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/Divine-Event/index.html>. El diagnóstico de PCR-TR puede mejorarse con la aplicación de la técnica de PCR-TR a tiempo real (*real time*). Esta técnica es más sensible y permite detectar y diferenciar entre genogrupos I y II más rápidamente. Se ha comprobado que la tecnología basada en sondas TaqMan es más específica que la basada en SYBR Green²⁶. El empleo de la técnica de PCR-TR a tiempo real se ha generalizado últimamente en laboratorios que procesan un elevado número de muestras.

Existen métodos comerciales basados en la detección de antígenos de norovirus por métodos inmunoenzimáticos. En general, estos métodos poseen una elevada especificidad pero una moderada sensibilidad. Además, tienen el problema de que son específicos para algunos norovirus, por lo que los resultados pueden variar según las cepas circulantes. Por lo tanto, si las muestras de brotes son negativas por análisis inmunoenzimático, los resultados deberían confirmarse por PCR-TR. Su utilidad depende de la relación entre sensibilidad y especificidad y variará dependiendo de si el objetivo es la investigación de un brote o el diagnóstico clínico de casos esporádicos. Estos métodos son especialmente útiles cuando hay que diagnosticar brotes de gastroenteritis de los que se dispone de muchas muestras. En esta situación, la detección fiable del virus en unos pocos casos es suficiente para la confirmación de la etiología de la enfermedad²⁷. En España existen dos ensayos inmunoenzimáticos comercializados para diagnosticar infecciones por norovirus: IDEIA® Norovirus (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) y RIDASCREEN® Norovirus (R-Biopharm). En comparación con la PCR-TR, la sensibilidad de los ensayos IDEIA® y RIDASCREEN® Norovirus es del 58,93 y 43,81%, con una especificidad del 93,91 y 96,37%, respectivamente²⁷. La sensibilidad de ambos ensayos aplicados a estudios de brotes de gastroenteritis mejoró cuando se evaluaron 6 o más muestras de un mismo brote. Actualmente, también se dispone de un método rápido consistente en un ELISA de membrana que detecta cepas de ambos genogrupos GI y GII (RIDA®QUICK Norovirus, R-Biopharm).

Debido a las dificultades técnicas, hasta ahora no se había desarrollado ninguna técnica inmunocromatográfica para el diagnóstico rápido de norovirus, como las existentes para rotavirus. Sin embargo, recientemente han aparecido publicaciones que describen el desarrollo y la aplicación diagnóstica de métodos inmunocromatográficos para norovirus. Estos trabajos demuestran que los equipos presentan niveles de sensibilidad cercanos al 100% y con una especificidad del 75%^{28,29}, aunque no están aún comercializados.

Conviene recordar que, ya en 1982, Kaplan y sus colaboradores establecieron unos criterios epidemiológicos que pueden ser útiles para sospechar que los norovirus son la causa de un brote de gastroenteritis: a) más de la mitad de los afectados evolucionan con vómitos; b) el período de incubación es de 24-48 h; c) la duración de la enfermedad es de 12 a 60 h, y d) la ausencia de patógenos bacterianos en los coprocultivos¹⁰. Estos criterios han sido posteriormente validados al resultar altamente específicos y razonablemente sensibles para diferenciar los brotes por norovirus de los debidos a otras causas³⁰.

Epidemiología

Los norovirus infectan a personas de todas las edades. Sin embargo, son considerados grupos de riesgo los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. Los brotes de gastroenteritis por norovirus se producen durante todo el año, aunque existe una mayor incidencia durante los meses más fríos en los países de clima templado³¹. Sin embargo, también se ha descrito un incremento de brotes

por norovirus en la primavera y el verano³² y en niños hospitalizados³³. La prevalencia de norovirus como causa de gastroenteritis esporádica seguramente está subestimada debido a que no se realiza habitualmente un diagnóstico específico³⁴. La aplicación de las técnicas de PCR-TR ha demostrado que los norovirus son una causa frecuente de gastroenteritis esporádica en todo el mundo y en todos los grupos de edad. Se ha calculado que representan, aproximadamente, el 12% (4,4-30,7%) de los casos de gastroenteritis grave en niños menores de 5 años en todo el mundo³⁴. Por lo tanto, la infección por norovirus parece ser la segunda causa de diarrea endémica en niños después de rotavirus.

En la mayoría de los brotes, las cepas más comunes son los genotipos o *clusters* del genogrupo II, especialmente el genotipo GII.4, que es el más frecuente. Este genotipo ha predominado durante los últimos 20 años en todo el mundo, siendo causante de pandemias de gastroenteritis por norovirus^{21,22}. En los últimos 15 años se han descrito seis subtipos o variantes de este genotipo, que han infectado a la población de forma secuencial³⁵. Como es lógico, el genotipo más prevalente en España en los últimos años ha sido también el GII.4^{36,37}.

Transmisión y control

Los norovirus poseen una serie de características que facilitan su propagación en brotes epidémicos. Su dosis infectiva es muy baja, ya que se calcula que 10 partículas víricas son suficientes para causar una infección. La excreción viral suele ser muy intensa, y persiste durante un período prolongado (hasta 2 semanas) incluso después de que hayan desaparecido los síntomas. La estabilidad de estos virus en el ambiente es relativamente alta, pudiendo persistir su infectividad en un amplio margen de temperaturas (desde la congelación hasta 60 °C) y resistir bien un pH ácido. Además, son relativamente resistentes a desinfectantes como el etanol y el cloro³⁸. Por último, una persona puede sufrir múltiples reinfecciones.

El modo de transmisión más importante es la ruta fecal-oral. La infección por norovirus se propaga muy rápidamente en establecimientos como hospitales, colegios y guarderías, hoteles o residencias, produciendo brotes epidémicos. Esto puede deberse en gran medida a la dispersión a través del vómito, tanto por la contaminación de fómites como por la formación de aerosoles. Se ha demostrado la persistencia de norovirus en superficies contaminadas durante el curso de un brote. La contaminación de los aseos públicos puede constituir una importante fuente de infección³⁹.

Los primeros casos de un brote aparecen frecuentemente tras la exposición al agua o a los alimentos contaminados y los contactos posteriores de persona a persona propagan la infección. Los alimentos pueden resultar contaminados directamente desde su origen (p. ej., moluscos, verduras o bayas cultivadas o silvestres) o por manipuladores de alimentos que estén infectados. Los moluscos (ostras, mejillones, almejas, etc.) son especialmente peligrosos porque concentran activamente los virus al filtrar grandes volúmenes de agua, y con frecuencia se consumen crudos o escasamente cocinados⁴⁰. Sin embargo, los principales alimentos que transmiten norovirus son las comidas preparadas y listas para consumir, especialmente aquellas que requieren manipulación pero no cocción⁴¹.

El control de los brotes por norovirus se basa en un diagnóstico temprano, la identificación del modo de transmisión y su interrupción. Se ha calculado que un diagnóstico en 3 días en vez de 4 días reduce la duración del brote en 7 días⁴². Normalmente se puede actuar a tres niveles: a) control de la comida o del agua contaminada; b) mantenimiento de una higiene estricta por los manipuladores de alimentos, y c) reducción de los casos secundarios a través del contacto entre personas. Las técnicas de PCR-TR pueden detectar ARN de norovirus en alimentos y agua⁴³. También se deben emplear medidas para evitar la contaminación de moluscos en áreas de cultivo de bivalvos, como la identificación de posibles fuentes de contami-

nación en las costas o la prohibición del vertido de aguas fecales desde barcos.

La transmisión por manipuladores de alimentos se debe prevenir mediante una estricta higiene personal y una adecuada desinfección de las superficies. Se recomienda que los trabajadores que hayan sufrido una gastroenteritis no se reincorporen al trabajo hasta 48-72 h después de su recuperación⁴³. No obstante, se ha comprobado que tras la enfermedad pueden excretar norovirus durante un período más prolongado de tiempo, por lo que sería recomendable aumentar este período de baja laboral²⁴. Puesto que esta medida no es práctica por motivos económicos, se pueden considerar otras alternativas como la asignación temporal del trabajador a una labor que no implique la manipulación de alimentos⁴⁴.

Una vacuna frente a norovirus podría ser una herramienta eficaz en la prevención de estas infecciones. Una de las estrategias más prometedoras consiste en la producción de VLP recombinantes expresadas en baculovirus o en plantas transgénicas, ya que se ha demostrado que son inmunogénicas y seguras cuando se inoculan oralmente a voluntarios⁴⁵. No obstante, existen muchos retos en el desarrollo de una potencial vacuna, como son nuestro conocimiento insuficiente de la correlación entre inmunidad y protección, la breve duración de la inmunidad, la ausencia de protección cruzada y la existencia de múltiples tipos genéticos y antigénicos de norovirus.

Conclusiones

En los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de las características biológicas, patogénicas y epidemiológicas de los norovirus humanos. Sin embargo, sería deseable disponer de métodos diagnósticos rápidos, sensibles, específicos y no muy costosos, que hicieran más asequible la detección de estos virus a la mayoría de los laboratorios. Muchas gastroenteritis agudas con coprocultivo negativo encontrarían entonces una explicación a su causa.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365:1147-52.
- Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:311-23.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2009;361:1776-85.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*. 1998;178:1571-8.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972;10:1075-81.
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*. 2009;44:1-8.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*. 2003;299:1575-8.
- Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006;346:312-23.
- Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol*. 1982;116:940-8.
- Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med*. 1982;96:756-61.
- Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr*. 2008;153:339-44.
- Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, et al. Management of hospital outbreaks of gastro-enteritis due to small roundstructured viruses. *J Hosp Infect*. 2000;45:1-10.

13. Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20:849-53.
14. Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, et al. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:693-9.
15. Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol.* 2003; 77:13117-24.
16. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis.* 1974;129:709-14.
17. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med.* 1977;297:86-9.
18. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003;9:548-53.
19. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol.* 2003;77:12562-71.
20. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidon MF, Montava R, 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.
21. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008;225:190-211.
22. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008;5:e31.
23. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990;161:18-21.
24. Rockx B, de Wit M, Vennema H, Vinje J, de Bruin E, van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002;35:246-53.
25. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* 2002;25:233-5.
26. Gunson RN, Carman WF. Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis of norovirus infection in outbreak and community settings. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2030-1.
27. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1349-55.
28. Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, et al. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods.* 2009;157:219-22.
29. Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Le Hoang P, Pham le D, Hoang KT, et al. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr.* 2007;53:264-9.
30. Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis.* 2006;42:964-9.
31. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 2:S284-7.
32. Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:71-7.
33. Boga JA, Melon S, Niecieza I, de Diego I, Villar M, Parra F, et al. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2668-74.
34. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1224-31.
35. Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, et al. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007;81:9932-41.
36. Dominguez A, Torner N, Ruiz L, Martinez A, Barrabeig I, Camps N, et al. Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *J Clin Virol.* 2008;43:126-31.
37. Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolome R, et al. Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol.* 2008;80:1288-95.
38. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, de Groot A, Twisk FKoopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:4538-43.
39. Cheesbrough JS, Green J, Gallimore CI, Wright PA, Brown DW. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect.* 2000;125:93-8.
40. le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:618-24.
41. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:95-102.
42. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, et al. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1827-34.
43. Morton V, Jean J, Farber J, Mattison K. Detection of noroviruses in ready-to-eat foods by using carbohydrate-coated magnetic beads. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:4641-3.
44. Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, et al. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep.* 2001;50:1-17.
45. Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology.* 1999;117:40-8.