

Norovirus y Otras Futuras Vacunas

MIGUEL O'RYAN G

Norovirus y Otras Futuras Vacunas

Miguel O’Ryan G

Profesor titular. Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile; Sillón N° 17 Academia de medicina, Instituto de Chile, Santiago de Chile

Introducción

Los virus del género norovirus pertenecen a la familia de los *Caliciviridae*, a la cual pertenecen también virus de estructura y composición semejante, aunque con diferencias genéticas que los catalogan en otros cuatro géneros: Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus, y Nebovirus. Solamente el norovirus y el sapovirus infectan a seres humanos, los restantes infectan a diversas especies animales. El “virus de Norwalk” fue el primer virus identificado de esta familia, en 1972, mediante la aplicación de microscopía electrónica al estudio de deposiciones obtenidas de individuos afectados en un brote escolar de enfermedad gastrointestinal ocurrido en la ciudad de Norwalk, Ohio, en 1968¹. Este brote afectó a un importante número de alumnos y profesores que sufrieron vómitos y diarrea aguda. A partir de entonces, investigadores de diferentes regiones del mundo identificaron numerosos virus de estructura semejante que causan brotes similares y a los que originalmente se les asignaron nombres relacionados al lugar de manifestación del brote (virus de Snow Mountain, South Hampton, México, etc.²). Años después se reclasificaron estos virus y agruparon en el género norovirus. Actualmente, el norovirus causa la mayor proporción de las infecciones por *Caliciviridae* en los seres humanos, seguido por el sapovirus con tasas de prevalencia que son sólo moderadamente inferiores a las del norovirus en algunos estudios recientes^{3,4}.

Los norovirus son virus relativamente pequeños de ~40nm de diámetro, con una estructura simple, compuesta de una proteína mayor (VP1) y una menor (VP2) que conforman su cápside, dentro del cual se aloja el ARN de una hebra. El virus carece de manto lipídico⁵.

Existe una importante diversidad genética entre los norovirus producto de mutaciones puntuales y fenómenos de recombinación genética^{2,6}. Por tal motivo, sobre la base de diferencias mayores o menores en las secuencias genéticas, se describen en la actualidad siete genogrupos (GI a GVII), con la detección de virus que infectan a humanos en los genogrupos GI, GII, GIV. Dentro de cada genogrupo existen variaciones menores de secuencia que determinan los genotipos. El virus Norwalk, por ejemplo, es un virus GI.1 (serotipo 1 perteneciente al genogrupo I); los virus que se detectan con mayor frecuencia en la actualidad pertenecen al genotipo 4 del genogrupo II (GII.4). Más aún, dentro de cada genotipo puede haber variaciones mínimas que se derivan en “variantes” que pueden ser importantes, como se señala a continuación².

La importancia potencial de esta diversidad genética radica en su función con respecto a cierta variabilidad de la virulencia vírica o antigenia que puede incidir en la susceptibilidad a infectar. La mayoría de las infecciones que afectan a humanos han sido causadas por norovirus perteneciente al serotipo GII.4, posiblemente asociado a su vez, con mayores tasas de hospitalización y muerte en comparación con otros serotipos^{7,8}. Este comportamiento epidemiológico puede deberse a que cuando una variación genética deriva en una variación antigénica

significativamente importante, el virus “nuevo” escapa a la inmunidad poblacional existente en un momento dado, generando un aumento en el número de casos, inclusive un aumento de casos más graves. Por ejemplo, dos variantes de GII.4 causaron brotes de gastroenteritis en Australia y Nueva Zelanda entre 2005 y 2006 y una de estas cepas se asoció con cerca del 25% de los brotes notificados en el Reino Unido en ese período⁹. En 2012 la cepa predominante en los Estados Unidos cambió de la cepa GII.4 variante “Nueva Orleans” a la variante “Sídney¹⁰” y, en 2014, surgió en Japón, el serotipo GII.17, el cual se diseminó al resto del mundo¹¹. Además del fenómeno poblacional caracterizado por el incremento de casos, la variabilidad genética/antigénica podría tener relevancia individual, relacionada con la posibilidad de reinfección (con una cepa circulante lo suficientemente diferente de una cepa infectante anterior) y por ende influir en la protección con vacunas como se analizará más adelante. En los últimos tiempos, se presentó el concepto de genotipos de norovirus “estáticos” o “en evolución”, en el que las cepas de GII.4 representan el genotipo con el número más alto de variantes que resultan en el reemplazo periódico de variantes (el genotipo predominantemente “en evolución”)¹².

El sapovirus, también se divide en genogrupos: GI a GV. A la fecha, todos los genogrupos, excepto GIII, han causado enfermedad en los seres humanos¹³.

Significación epidemiológica e impacto de la enfermedad

La primera caracterización nosológica asociada a esta familia de virus, durante la década de los 70, fue denominada “gastroenteritis típica del invierno”. Se trataba de brotes de diferentes magnitudes (desde pocos casos intrafamiliares a cientos de casos en colegios y comunidades) caracterizados por vómitos abruptos, seguidos de diarrea acuosa, con o sin fiebre de grado más bien bajo, durante unos pocos días. La fuente infectante más común era agua o alimento contaminado. Hoy sabemos que los norovirus infectan a personas de todas las edades, desde lactantes pequeños hasta ancianos. La gran mayoría, por no decir todas las personas a nivel mundial, contraen la infección al menos una vez y, por lo general, múltiples veces a lo largo de la vida. La mayoría de los episodios de infección son leves o asintomáticos, y si bien solo una fracción presentará un cuadro clínico moderado a grave con riesgo de deshidratación, la alta frecuencia de la infección determina que esta fracción sea epidemiológicamente significativa^{2,14,15}. Como se describirá más adelante, estudios de cohorte en niños sugieren que la probabilidad de sufrir una segunda infección sintomática por el mismo serogrupo que la infección previa podría ser baja (aunque esta observación no es aún concluyente), lo cual crea la posibilidad de protección “natural”.

La diarrea aguda por norovirus se caracteriza por la emisión de entre 4 y 8 deposiciones diarias de carácter acuoso o semiformadas y carentes de sangre. Son frecuentes los vómitos intensos antes del inicio de la diarrea, incluso como los síntomas únicos relevantes de la infección. Los adultos suelen indicar que sufren de mialgias generalizadas, decaimiento y cefalea, la cual llega a ser intensa. En aproximadamente la mitad de los casos, se notifica fiebre leve, moderada o alta (sólo en una baja proporción de casos)^{2,14,16}. Los niños menores de 12 meses, las personas con algún nivel de deficiencia inmunológica u hospitalizadas que contraen una infección nosocomial, y los ancianos son los grupos con mayor riesgo de enfermedad grave por norovirus^{2,16-18}. Las secuelas de la infección comprenden dispepsia, constipación y reflujo gastroesofágico¹⁹. En lactantes, se han descrito episodios convulsivos asociados con la infección, así como encefalitis (con menor frecuencia)²⁰⁻²².

Los norovirus se asocian a dos situaciones clínico-epidemiológicas características: brotes provocados por el consumo de agua o alimentos contaminados y gastroenteritis endémica aguda de la niñez.

Se han descrito brotes en puntos múltiples, como en embarcaciones crucero vacacionales y buques de guerra, colegios, restaurantes, hogares de ancianos, escuelas de verano, centros vacacionales y comunidades, entre muchos otros lugares en donde un producto contaminado puede infectar a varias personas y, en el lapso de unas cuantas horas, infectar a otros a través de contagio por las vías fecal a oral o exclusivamente oral². Si bien los moluscos bivalvos han sido particularmente implicados en muchos de estos brotes, se sabe que otros productos vegetales y animales, así como el agua pueden ser fuentes contaminantes y causantes de brotes. Sobre la base de estudios epidemiológicos realizados en países con buenos sistemas de vigilancia, se ha podido establecer que el norovirus causa cerca del 50% o más de los brotes producidos por consumo de agua o alimentos en países de nivel socioeconómico medio a alto^{23,24}. En una estimación reciente se concluyó que, en 2010, el norovirus causó cerca de 125 millones de casos de gastroenteritis debido al consumo de agua o alimentos y produjo 35.000 muertes²⁵. En un brote por norovirus, los individuos con la mayor exposición al producto contaminado, adultos por lo general si bien no exclusivamente, son los más afectados. Son particularmente dañinos los brotes que ocurren en hospitales y en casas de reposo en donde el riesgo de sufrir consecuencias graves (deshidratación, desequilibrio hidroelectrolíticos y muerte) es mayor debido a la vulnerabilidad de las personas²⁶⁻²⁸. En personas inmunodeficientes, se describe excreción marcadamente prolongada de norovirus en deposiciones, hasta por años, y ocasionalmente casos de diarrea intensa o prolongada de muy difícil tratamiento²⁹. Entre los individuos con trasplante de órganos sólidos, la infección por norovirus puede provocar índices de morbilidad marcados debido a la prolongación de la diarrea^{30,31}.

En niños menores de 5 años que viven en países de nivel socioeconómico medio y medio-alto, en la actualidad, el norovirus es la segunda causa más frecuente de gastroenteritis aguda endémica después del rotavirus. En países de ingresos altos que han implementado la vacunación sistemática contra el rotavirus, como por ejemplo Estados Unidos y Finlandia, el norovirus ha pasado a ser la causa más común de hospitalización y consultas médicas por diarrea aguda en niños^{32,33}. En países de ingresos bajos, como Nicaragua, el norovirus parece ser igualmente importante, en especial después de la introducción de la vacuna antirrotavírica⁴. En países sumamente pobres de África y Asia, el estudio de casos y controles llevado a cabo por el Estudio Multicéntrico Entérico Mundial (GEMS) identificó rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella spp* y *Cryptosporidium* como los microorganismos más comúnmente asociados con diarrea moderada a aguda³⁴, y el norovirus fue relevante solamente en unos cuantos sitios. La metodología utilizada en el estudio GEMS podría influir en los resultados y conclusiones de otros estudios en regiones semejantes que han sugerido previamente que el norovirus es un patógeno importante^{35,36}.

En un análisis reciente de estudios dirigidos a medir el impacto de la infección por norovirus en América Latina, concluimos que entre el 14% y el 16% de los episodios de gastroenteritis aguda en niños (casos que requieren hospitalización o consulta en una clínica ambulatoria) fueron causados por norovirus³⁷. En otras palabras, el norovirus se asoció con uno de cada seis episodios de diarrea aguda en niños latinoamericanos.

Si bien la gastroenteritis por norovirus, en general, es menos aguda que la producida por el rotavirus, los cuadros clínicos de ambas pueden ser indiferenciables habida cuenta de que ambas producen deshidratación debido a vómitos intensos y diarrea acuosa frecuente¹⁴.

Prevención

La posibilidad de sufrir una infección por norovirus comienza poco tiempo después del nacimiento. Estudios de cohortes demuestran exposiciones múltiples a lo largo de la vida^{15,38,39}. La vía de transmisión es principalmente fecal-oral, en especial para la gastroenteritis endémica cuando una persona sintomática o, con bastante frecuencia, un excretor asintomático transmite la infección a un individuo susceptible. También es posible la transmisión por vía oral en el caso de personas que padecen vómitos^{40,41}. Alimentos y agua contaminados son la fuente primaria de los brotes, seguidos por la transmisión interpersonal. La diseminación de esta infección está facilitada por su dosis infectante baja (entre 20 y 1.000 partículas víricas para infectar a una persona), la excreción prolongada en deposiciones (entre 2 y 4 semanas) y la estabilidad relativa en el medio ambiente, alimentos y agua, en comparación con otros virus^{2,42}.

La posibilidad de prevención vacunal se ha considerado desde hace mucho tiempo una posibilidad remota por varios motivos:

- La diversidad de genotipos, los cuales pueden o no tener inmunidad cruzada.
- La repetición de infecciones a lo largo de la vida, lo que llevó a pensar que el virus no desarrolla inmunidad protectora de larga duración.
- Estudios en voluntarios adultos entre las décadas de 1970 y 1990, que concluyeron que la inmunidad conferida por exposición a un inóculo vírico (contra virus semejantes solamente) podría ser de corta duración (entre 6 y 14 semanas)⁴³⁻⁴⁵.

Sin embargo, estudios más recientes son indicativos de lo siguiente:

- La inmunidad luego de infección natural puede durar varios años⁴⁶.
- En niños, la reinfección es frecuente pero la reinfección sintomática no es tan usual y la exposición a un virus perteneciente a un genogrupo puede conferir un alto grado de protección contra la reexposición a un virus perteneciente al mismo genogrupo¹⁵.

Además, cabe destacar que, al igual que con otros microorganismos entéricos, algunos genogrupos de norovirus se adhieren a los antígenos A, B, H y de Lewis (de los oligosacáridos pertenecientes a los antígenos histosanguíneos) en la superficie intestinal, y algunos individuos carecen de dichos antígenos (denominados antígenos no secretores), por lo que son naturalmente inmunes a la infección. La fijación a los receptores aparentemente es común entre variantes del mismo genogrupo y de genogrupos diferentes pues estudios recientes indican que existiría inmunidad cruzada entre variantes al estudiar anticuerpos que bloquean la fijación molecular de los virus^{47,48}. Esta determinación sugiere que podría existir la posibilidad de inmunidad cruzada para la fijación vírica entre variantes dentro del mismo genogrupo y de otros genogrupos.

En 2011, se diseñó un estudio de comprobación de concepto para aumentar al máximo la posibilidad de formular vacunas eficientes con un prototipo de vacuna intranasal con el genotipo GI.1 que confería protección a adultos voluntarios expuestos experimentalmente al virus GI.1⁴⁹.

Formulación de vacunas: ¿Cuál es la situación actual?

A la fecha, los norovirus son virus no cultivables, es decir que no se ha hallado aún un sistema que permita reproducir el virus, situación que podría cambiar en un futuro próximo dado que dos sistemas de cultivo para norovirus humano han mostrado resultados promisorios^{50,51}. La imposibilidad de realizar un cultivo ha obstaculizado la formulación de vacunas atenuadas elaboradas con virus vivos, como es el caso de la vacuna antirrotavírica. En el cuadro a continuación se describen las vacunas experimentales actualmente en el mercado (tabla 1).

Tabla 1. Vacunas experimentales contra norovirus

Antígenos incluidos en la vacuna	Fase Clínica o Preclínica en que se encuentra	Referencias
VLP GI.1 y GII.4	Estudio de fase I completado en adultos, avance a estudios de fase II en adultos y niños.	49,60,61
VLP GI.3 y GII.4 más rotavirus rVP6	Inmunogénico en el modelo murino BALB/c; aún no se iniciaron los estudios clínicos en seres humanos.	62
Partícula-P	Inmunogénico en el modelo murino BALB/c y modelo notobiótico; aún no se iniciaron los estudios clínicos en seres humanos.	53,63,64
Partículas replicativas en vectores víricos	Inmunogénicos en el modelo murino BALB/c; se notificó un estudio clínico de fase I si bien aún resta presentar los datos.	65,66,67

La formulación de antígenos contra el norovirus se ha basado primordialmente en el uso de herramientas moleculares, específicamente la expresión de proteínas víricas mediante sistemas de expresión génica, tales como células de insectos que son susceptibles a infectarse con un virus denominado "baculovirus", el cual puede recombinarse con genes de norovirus⁵². Por otra parte, se han usado también otras células eucarióticas como sistemas de expresión, entre ellas las levaduras. Estos sistemas permiten la incorporación de genes específicos de norovirus, en particular genes de la cápside vírica para fines vacunales. Estos genes se traducen en proteínas automontantes, lo cual conforma espontáneamente una gran cantidad de cápsides "vacías" que se asemejan a la cápside vírica del virus nativo, sin el ARN vírico. De este modo, estas son partículas no infecciosas denominadas partículas similares a los virus (VLP, por sus siglas en inglés).

También se han sintetizado partículas correspondientes a una porción de la cápside, la partícula P que corresponde al dominio P de la proteína VP1, la cual es la parte sobresaliente de la cápside más expuesta al medio ambiente⁵³. Estas partículas se pueden sintetizar en células bacterianas como *Escherichia coli* y simplificar su producción a gran escala. Por otro lado, estas partículas se pueden combinar con otros antígenos (rotavirus, gripe, hepatitis E, VIH) y crear una plataforma para conferir protección adicional contra más de un virus^{54,55}.

Una tercera estrategia ha sido incorporar genes de cápside de norovirus en vectores víricos para utilizar estas estructuras del tipo de plásmidos recombinados a fin de generar inmunidad en las personas. A la fecha se han realizado experimentos con el virus de la estomatitis vesicular⁵⁶, el virus de Newcastle virus⁵⁷, el adenovirus⁵⁸ y el virus de la encefalitis equina venezolana⁵⁹, para inducir "in vivo" (es decir en la persona y no en un sistema de expresión como se describe en los párrafos anteriores) la síntesis de partículas similares a los virus y proteger a las personas vacunadas. De las tres estrategias expuestas (las partículas similares a los virus, la partícula P y los vectores víricos) solamente la primera forma parte de una fase de estudio clínico y, por ende, permite vislumbrar una vacuna viable en

los próximos cinco años. El uso de vectores víricos tendrá que sortear una serie de percepciones sobre la inocuidad antes de que se puedan realizar las pruebas en los seres humanos. En un comunicado de prensa reciente se informó sobre la finalización de un estudio de fase I con un adenovirus no replicante recombinado que contiene la partícula P del norovirus en adultos, pero aún restan datos por presentar.

A la fecha, la vacuna experimental más avanzada evaluada en tres estudios clínicos se basa en partículas similares a virus (véase la tabla 2). En el primer estudio (estudio de comprobación de concepto) se demostró que en voluntarios adultos inoculados intranasalmente con la vacuna monovalente de GI.1 complementada con monofosforil Lípido A (MPL), además de quitosán, se redujeron los episodios de gastroenteritis en un 47% (IC 95%: 15–67%) al cabo de una infección experimental con el virus de GI.1 en voluntarios adultos. Se notificaron efectos adversos locales y sistémicos en cerca del 70% de los participantes vacunados, sin establecer diferencia entre los vacunados con la vacuna o el placebo⁴⁹. La estrategia para la formulación de vacunas se modificó de una vacuna intranasal a una intramuscular debido a que esta última demostró mayor eficiencia en la administración de antígenos y mejores respuestas de anticuerpos en adultos con un nivel de dosis más bajo y con menos dosis que las formulaciones intranasales.

La reactogenia cruzada baja entre los genogrupos y la frecuencia alta de la infección por norovirus del tipo GII llevó a la formulación de una vacuna bivalente de GI.1 y GII.4. En un primer estudio se concluyó que la dosis de 50ug (complementada con MPL) por cada antígeno confería la respuesta inmunitaria óptima con nivel aceptable de efectos adversos en gran parte moderados en el punto de inoculación⁶⁰. En el segundo estudio utilizando la vacuna de GI.1/GII.4 en dosis de 50ug (complementada con MPL) por antígeno, administrada en voluntarios adultos, se observó un efecto protector contra una infección experimental por norovirus GII.4. El estudio no fue óptimo porque el nivel de infección y enfermedad alcanzado en los voluntarios en general fue inferior al previsto, pero se demostró protección⁶¹.

Tabla 2. Desenlace principal de estudios clínicos en seres humanos utilizando vacunas con VLP

Vacuna experimental	Desenlace principal	Referencia
GI.1 de VLP con adyuvante de administración intranasal	Estudio central con dos dosis y control con placebo en 77 adultos expuestos a norovirus GI.1 demostró una reducción de la gastroenteritis por norovirus en un 47%.	49
GI.1 y GII.4 de VPL con adyuvante de administración intramuscular	Estudio con dos dosis y control con placebo con diversas concentraciones para determinar la inocuidad e inmunogenia demostró buena tolerancia con diferentes concentraciones y una rápida respuesta de anticuerpos luego de la primera dosis.	60
GI.1 y GII.4 de VPL con adyuvante de administración intramuscular	Estudio con dos dosis y control con placebo en 98 adultos expuestos posteriormente a norovirus GII.4 demostró una reducción de la gastroenteritis aguda (0% contra 8,3%, $p=0,054$), moderada a aguda (6% contra 18,8%, $p=0,68$), leve a aguda (20% contra 37,5%, $p=0,74$) inducida por norovirus y una reducción de la gravedad (Puntuación de Vesikari 4,5 contra 7,3, $p=0,002$).	61
GI.1 y GII.4 de VPL con adyuvante de administración intramuscular	Se evaluaron dos formulaciones de 15 o 50 μ g de GI.1 combinadas con 50 μ g de GII.2 en 442 adultos sanos de entre 18 y 49 años de edad. Las reacciones fueron principalmente leves a moderadas en el 64% y el 73% de los niños vacunados, respectivamente, en comparación con el 8% de los controles con placebo. Las respuestas inmunitarias a la vacunación alcanzaron un pico en los días 7 a 10 y persistieron hasta el día 28. Las respuestas de GI.1 fueron más altas con la formulación 50/50, pero las respuestas de GII.4 fueron más altas con la formulación 15/50. Los autores concluyen que la formulación 15/50 mostró el mejor equilibrio de tolerabilidad e inmunogenia.	68

¿Cómo utilizaremos las vacunas contra el norovirus?

La primera generación de vacunas contra el norovirus para administración intramuscular tanto en lactantes como en adultos seguramente estará disponible hacia 2020–2022 de no mediar ningún contratiempo mayor. La utilización de la vacuna dependerá de varios factores que se deberán ir dilucidando durante los estudios de fase II y fase III, y a posteriori. La eficacia protectora contra los serogrupos prevalentes, especialmente del genogrupo GII así como el espectro de inmunidad cruzada entre variantes dentro del mismo genogrupo y de otros serogrupos será fundamental para la aceptación de la vacuna. Una vacuna que demuestre protección contra el 70% al 80% o más de los norovirus circulantes que afectan a las personas probablemente entusiasme a los encargados de tomar decisiones en materia de vacunación. La duración de la inmunidad será igualmente importante tanto para administración en adultos como en lactantes. Para los adultos tal vez se necesite la revacunación dentro de unos cuantos años según la robustez de la protección, lo cual podría ser aceptado por grupos específicos como viajeros o personal militar. Por el contrario, el uso de la vacuna durante los primeros meses de vida para proteger a niños, de manera similar a la vacunación antirrotavírica, no debiera necesitar revacunación más adelante a fin de no disminuir el entusiasmo en torno a su aplicación. A diferencia del rotavirus, esta es una vacuna experimental contra el norovirus con antígenos que no se multiplican. En consecuencia, si bien no es ideal, seguramente se requiera más de dos dosis para lograr un buen nivel de inmunidad protectora. La edad de vacunación será un tema importante a definir en lactantes considerando la necesidad de proteger precozmente antes de los 12 meses de vida dado que el calendario de vacunación es bastante prolífico a los 12 meses. A medida que vacunas inyectables nuevas ingresen al mercado para disminuir la morbimortalidad en los niños, como es el caso de una vacuna contra norovirus, se debe considerar la posibilidad de vacunación a otras edades además del calendario actual (a los 3, 5 y 7 meses, por ejemplo). Un desafío importante a futuro será la formulación de vacunas combinadas de nueva generación que permitan disminuir las inoculaciones y mantener la inmunogenia de los diferentes componentes incluidos en las vacunas combinadas. La combinación de antígenos recombinados de norovirus y rotavirus surge como una opción interesante, así como el uso de la partícula P como plataforma para otros antígenos. Sin embargo, estas estrategias requieren de varios años de análisis.

Conclusión

En los últimos 40 años, se lograron grandes avances en el estudio de la estructura del norovirus, los mecanismos infecciosos animales y humanos, las respuestas inmunitarias, la epidemiología y la epidemiología molecular. La comprensión de la inmunidad protectora en niños y adultos, a la luz de la variabilidad marcada de los virus circulantes, sigue siendo parcial al momento. Sin embargo, las iniciativas en torno a las vacunas están en marcha y las vacunas experimentales se basan actualmente en partículas de cápside externa sintetizada, similares a los virus (VLP) o con partícula P sobresaliente. Se ha logrado la comprobación del concepto de la protección vacunal en el caso de las partículas similares a virus intranasales en adultos. La vacuna experimental más avanzada es una vacuna con partículas similar al virus bivalente de GI.1/GII.4 para administración intramuscular, de inmunogenia comprobada en adultos. Se proyectan realizar estudios futuros de fase II y III en adultos y niños.

Declaración de conflicto de intereses

El doctor Miguel O’Ryan ha recibido financiamiento de Takeda Vaccines para la investigación a fin de realizar estudios epidemiológicos sobre el norovirus.

Referencias

1. 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. *Journal of Virology* 1972; 10(5):1075–1081.
2. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361(18):1776–1785.
3. Tam CC, O’Brien SJ, Tompkins DS, et al. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 54(9):1275–1286.
4. Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS One* 2014; 9(5):e98201.
5. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science (New York, NY)*. 1993; 259(5094):516–519.
6. Vidal R, Roessler P, Solari V, et al. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(6):2271–2275.
7. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 200(5):802–812.
8. Desai R, Hembree CD, Handel A, et al. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;55(2):189–193.
9. Tu ET, Bull RA, Greening GE, et al. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; 46(3):413–420.
10. Siqueira JA, Linhares Ada C, de Carvalho TC, et al. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belem, Para, Northern Brazil. *Journal of Medical Virology* 2013; 85(4):737–744.
11. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus — End of the GII.4 era? *Euro surveillance: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2015;20(26).
12. Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, et al. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathogens* 2017;13(1):e1006136.
13. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28(1):32–53.
14. O’Ryan ML, Pena A, Vergara R, et al. Prospective characterization of norovirus compared with rotavirus acute diarrhea episodes in Chilean children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2010; 29(9):855–859.
15. O’Ryan ML, Lucero Y, Prado V, et al. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009; 28(10):879–884.
16. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004; 39(3):318–324.
17. Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, Kelly H, Marshall JA. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *The Journal of hospital infection* 2004; 58(4):286–291.
18. Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: a systematic literature review. *American journal of infection control* 2013; 41(7):654–657.
19. Porter CK, Faix DJ, Shiau D, Espiritu J, Espinosa BJ, Riddle MS. Postinfectious gastrointestinal disorders following norovirus outbreaks. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;55(7):915–922.
20. Bartolini L, Mardari R, Toldo I, et al. Norovirus gastroenteritis and seizures: an atypical case with neuroradiological abnormalities. *Neuropediatrics* 2011; 42(4):167–169.
21. Chan CM, Chan CW, Ma CK, Chan HB. Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2011;47(6):373–377.
22. Sanchez-Fauquier A, Gonzalez-Galan V, Arroyo S, Roda D, Pons M, Garcia JJ. Norovirus-associated encephalitis in a previously healthy 2-year-old girl. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2015; 34(2):222–223.

23. Vidal R, Solari V, Mamani N, et al. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(7):1134–1137.
24. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17(1):7–15.
25. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine* 2015; 12(12):e1001923.
26. Loury P, Le Guyader FS, Le Saux JC, Ambert-Balay K, Parrot P, Hubert B. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. *Epidemiology and Infection* 2015;143(12):2486–2493.
27. Gaspard P, Ambert-Balay K, Mosnier A, et al. Burden of gastroenteritis outbreaks: specific epidemiology in a cohort of institutions caring for dependent people. *The Journal of Hospital Infection* 2015; 91(1):19–27.
28. Barret AS, Jourdan-da Silva N, Ambert-Balay K, et al. Surveillance for outbreaks of gastroenteritis in elderly long-term care facilities in France, November 2010 to May 2012. *Euro Surveill: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 2014; 19(29).
29. Ye X, Van JN, Munoz FM, et al. Noroviruses as a Cause of Diarrhea in Immunocompromised Pediatric Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2015; 15(7):1874–1881.
30. van Beek J, van der Eijk AA, Fraaij PL, et al. Chronic norovirus infection among solid organ recipients in a tertiary care hospital, the Netherlands, 2006–2014. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017; 23(4):265.e269–265.e213.
31. Avery RK, Lonze BE, Kraus ES, Marr KA, Montgomery RA. Severe chronic norovirus diarrheal disease in transplant recipients: Clinical features of an under-recognized syndrome. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society* 2017; 19(2).
32. Payne DC, Vinje J, Szilagyi PG, et al. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *The New England Journal of Medicine* 2013;368(12):1121–1130.
33. Hemming M, Rasanen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr* 2013; 172(6):739–746.
34. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet (Londres, Inglaterra)* 2013; 382(9888):209–222.
35. Munjita SM. Current Status of Norovirus Infections in Children in Sub-Saharan Africa. *Journal of Tropical Medicine* 2015; 2015:309648.
36. Operario DJ, Platts-Mills JA, Nadan S, et al. Etiology of Severe Acute Watery Diarrhea in Children in the Global Rotavirus Surveillance Network Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 2017; 216(2):220–227.
37. O’Ryan M, Riera-Montes M, Lopman B. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2017; 36(2):127–134.
38. Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, et al. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; 58(4):483–491.
39. Lopman BA, Trivedi T, Vicuna Y, et al. Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. *The Journal of Infectious Diseases* 2015; 211(11):1813–1821.
40. Kirby A, Dove W, Ashton L, Hopkins M, Cunliffe NA. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2010; 48(4):285–287.
41. Tung-Thompson G, Libera DA, Koch KL, de Los Reyes FL, 3rd, Jaykus LA. Aerosolization of a Human Norovirus Surrogate, Bacteriophage MS2, during Simulated Vomiting. *PLoS One* 2015; 10(8):e0134277.
42. Knight A, Haines J, Stals A, et al. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International Journal of Food Microbiology* 2016; 216:40–49.
43. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *The New England Journal of Medicine* 1977; 297(2):86–89.
44. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *The Journal of Infectious Diseases* 1990; 161(1):18–21.

45. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *The Journal of Infectious Diseases* 1974; 129(6):709–714.
46. Simmons K, Gambhir M, Leon J, Lopman B. Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* 2013;19(8):1260–1267.
47. Dai YC, Zhang XF, Xia M, et al. Antigenic Relatedness of Norovirus GII.4 Variants Determined by Human Challenge Sera. *PLoS One* 2015; 10(4):e0124945.
48. Czako R, Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Estes MK. Experimental human infection with Norwalk virus elicits a surrogate neutralizing antibody response with cross-genogroup activity. *Clinical and Vaccine Immunology: Cvi* 2015;22(2):221–228.
49. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *The New England Journal of Medicine* 2011;365(23):2178–2187.
50. Jones MK, Grau KR, Costantini V, et al. Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols* 2015; 10(12):1939–1947.
51. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (New York, NY)* 2016; 353(6306):1387–1393.
52. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology* 1992; 66(11):6527–6532.
53. Fang H, Tan M, Xia M, Wang L, Jiang X. Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. *PLoS One* 2013; 8(4):e63269.
54. Zang Y, Bi J, Du D, et al. Development of a Norovirus P particle platform for eliciting neutralizing antibody responses to the membrane proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 envelope. *Protein and Peptide Letters* 2014; 21(12):1230–1239.
55. Wang L, Cao D, Wei C, Meng XJ, Jiang X, Tan M. A dual vaccine candidate against norovirus and hepatitis E virus. *Vaccine* 2014; 32(4):445–452.
56. Ma Y, Li J. Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus. *J Virol* 2011; 85(6):2942–2952.
57. Kim SH, Chen S, Jiang X, Green KY, Samal SK. Newcastle disease virus vector producing human norovirus-like particles induces serum, cellular, and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 2014; 88(17):9718–9727.
58. Guo L, Wang J, Zhou H, et al. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine* 2008;26(4):460–468.
59. Baric RS, Yount B, Lindesmith L, et al. Expression and Self-Assembly of Norwalk Virus Capsid Protein from Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicons. *J Virol* 2002; 76(6):3023–3030.
60. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A Novel Intramuscular Bivalent Norovirus VLP Vaccine Candidate — Reactogenicity, Safety and Immunogenicity in a phase I trial in healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases* 2014.
61. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis* 2015; 211(6):870–878.
62. Tamminen K, Lappalainen S, Huhti L, Vesikari T, Blazevic V. Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice. *PLoS One* 2013; 8(7):e70409.
63. Tan M, Jiang X. Vaccine against norovirus. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2014;10(6).
64. Kocher J, Bui T, Giri-Rachman E, et al. Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs. *J Virol* 2014;88(17): 9728–9743.
65. LoBue AD, Thompson JM, Lindesmith L, Johnston RE, Baric RS. Alphavirus-adjuvanted norovirus-like particle vaccines: heterologous, humoral, and mucosal immune responses protect against murine norovirus challenge. *J Virol* 2009; 83(7):3212–3227.
66. Kim SH, Chen S, Jiang X, Green KY, Samal SK. Immunogenicity of Newcastle disease virus vectors expressing Norwalk virus capsid protein in the presence or absence of VP2 protein. *Virology* 2015; 484:163–169.
67. Guo L, Zhou H, Wang M, et al. A recombinant adenovirus prime-virus-like particle boost regimen elicits effective and specific immunities against norovirus in mice. *Vaccine* 2009; 27(38):5233–5238.
68. Atmar RL, Baehner F, Cramer JP, Song E, Borkowski A, Mendelman PM. Rapid Responses to 2 Virus-Like Particle Norovirus Vaccine Candidate Formulations in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Infectious Diseases* 2016; 214(6):845–853.