

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

Marco André Loureiro Tonini

**GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A E ANTÍGENOS DE GRUPO
SANGUÍNEO EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA INFECTADAS POR
ROTAVÍRUS E NOROVÍRUS**

**Vitória - ES
2021**

Marco André Loureiro Tonini

**GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A E ANTÍGENOS DE GRUPO
SANGUÍNEO EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA INFECTADAS POR
ROTAVÍRUS E NOROVÍRUS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Liliana Cruz Spano

**Vitória – ES
2021**

À minha esposa, Aline, e ao meu filho, Matheus, que constituem à minha família, alicerce que Deus me concedeu para essa conquista.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo infinito amor e bondade, por me dar força, sabedoria e perseverança;
- À Liliana, minha orientadora, por me conceder essa oportunidade de crescimento profissional e confiar em meu trabalho. Admiro sua dedicação e competência como professora e pesquisadora, e agradeço por todo auxílio sem medidas dado ao longo desse trabalho;
- Aos amigos do LabViG, Débora, Lays, Luciana, Caroline, Lucas, Núbia, Thainá e Willamis, pelo companheirismo, generosidade e ajuda essencial na execução dessa tese;
- Ao Dr. Jacques Le Pendu, referência mundial no estudo dos HBGAs, pela sua intensa colaboração ao longo desse estudo e por disponibilizar seu laboratório na França e sua equipe para realizarmos parte dos nossos experimentos, etapa primordial para a elaboração do manuscrito fruto dessa tese;
- À minha esposa, Aline, pelo amor, cumplicidade e paciência. Sem você ao meu lado esse projeto não se concretizaria;
- Aos meus pais, pelo amor, pelas orações, pelos inúmeros ensinamentos e por sempre me estimularem a estudar cada vez mais;
- Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do HUCAM pelo suporte e companheirismo ao longo dessa jornada.

PREÂMBULO

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

(i) uma publicação de artigo como primeiro autor (Anexo 3) na qual descrevemos a associação dos antígenos de grupo sanguíneo (HBGA) em crianças com diarreia aguda infectados por rotavírus e norovírus no Brasil;

(ii) uma publicação de artigo como coautor (Anexo 4) com a descrição de uma recombinante emergente de norovírus GII.P16-GII.4 Sydney 2012 pela primeira vez no Brasil;

(iii) Dados Complementares (Item 5), nos quais estão descritos resultados obtidos e ainda não registrados em manuscritos.

RESUMO

Rotavírus e norovírus são as principais causas de diarreia aguda em crianças no mundo. A susceptibilidade do hospedeiro de acordo com os antígenos de grupo sanguíneo (HBGAs) é amplamente conhecida para a infecção por norovírus, mas menos descrita para o rotavírus. Devido ao polimorfismo variável de HBGA entre populações, nosso objetivo foi avaliar a associação entre os fenótipos de HBGA (ABH, Lewis e status secretor) e a susceptibilidade à infecção sintomática por rotavírus e norovírus, e os polimorfismos de *FUT2* e *FUT3*, de crianças da região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, sudeste do Brasil. Além disso, avaliamos os genótipos P e G de rotavírus e os genótipos de norovírus que infectaram essas crianças. Amostras fecais de 307 crianças com diarreia aguda e swabs bucais de 272 dessas foram usados para detectar e determinar os genótipos de rotavírus/norovírus e fenótipos/genótipos de HBGAs, respectivamente. Ao todo, 101 (32,9%) crianças foram infectadas por rotavírus e/ou norovírus. O genótipo G12P[8] (48,6%) de rotavírus foi o mais frequentemente detectado entre as amostras seguido de G3P[8] (11,4%) e G2P[4] (5,7%). O sequenciamento de nucleotídeos das amostras G3P[8], único genótipo detectado nas amostras de 2018, demonstrou que essas pertencem ao genótipo emergente G3P[8] “equine-like”, cepa predominante atualmente nos casos de diarreia no Brasil e no mundo. A maioria dos norovírus (93,8%) pertenceu ao genogrupo II (GII). O genótipo GII.4 Sydney representou 76% (35/46) entre cinco outros genótipos. Rotavírus e norovírus infectaram predominantemente crianças com o status secretor (97% e 98,5%, respectivamente). No entanto, menos crianças infectadas por rotavírus eram Lewis-negativas (8,6%) do que as infectadas por norovírus (18,5%). Os polimorfismos de um nucleotídeo (SNP – “single nucleotide polymorphisms”) em *FUT3* ocorreram principalmente nas posições T59G > G508A > T202C > C314T. O domínio de genótipos emergentes no estudo evidencia a importância de uma vigilância contínua dos rotavírus com o objetivo de monitorar o surgimento de genótipos incomuns e o impacto que podem trazer para o programa de vacinação. Além disso, nossos resultados reforçam o conhecimento de que os indivíduos secretores são mais suscetíveis à infecção por rotavírus e norovírus do que os não secretores. A alta taxa de Lewis negativo (17,1%) e a combinação de SNPs, além do status de secretor, podem refletir a grande heterogeneidade da população no Brasil.

ABSTRACT

Rotavirus and norovirus are the leading cause of acute diarrhea in children worldwide. Host susceptibility according to human histo-blood group antigens (HBGAs) is widely known for norovirus infection, but is less described for rotavirus. Due to the variable HBGA polymorphism among populations, we aimed to evaluate the association between HBGA phenotypes (ABH, Lewis and secretor status) and susceptibility to rotavirus and norovirus symptomatic infection, and the polymorphisms of *FUT2* and *FUT3*, of children from southeastern Brazil. Moreover, we evaluated the rotavirus P and G genotypes and norovirus genotypes infecting these children. Fecal samples from 307 children with acute diarrhea and buccal swabs from 272 of those were used to detect and determine rotavirus and norovirus genotypes and HBGAs phenotypes and genotypes, respectively. Altogether, 100 (36.8%) children were infected with rotavirus and norovirus. The rotavirus G12P[8] (48,6%) genotype was the most frequently among the samples followed by G3P[8] (11,4%) and G2P[4] (5,7%). The nucleotide sequencing of G3P[8] samples, the only genotype detected in the 2018 samples, demonstrated that they belonged to the emergent G3P[8] “equine-like” genotype, the strain that predominates currently in cases of diarrhea in Brazil and worldwide. Most of the noroviruses (93.8%) belonged to genogroup II (GII). GII.4 Sydney represented 76% (35/46) amongst five other genotypes. Rotavirus and noroviruses infected predominantly children with secretor status (97% and 98.5%, respectively). However, fewer rotavirus-infected children were Lewis-negative (8.6%) than the norovirus-infected ones (18.5%). *FUT3* single nucleotide polymorphisms (SNP) occurred mostly at the T59G > G508A > T202C > C314T positions. The predominance of emerging genotypes in the study shows the importance of continuous surveillance of rotaviruses in order to monitor the emergence of unusual genotypes and the impact they can bring to the vaccination program. In addition, our results reinforce the current knowledge that secretors are more susceptible to infection by both rotavirus and norovirus than non-secretors. The high rate for Lewis negative (17.1%) and the combination of SNPs, beyond the secretor status, may reflect the highly mixed population in Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do rotavírus em forma de roda vista por microscopia eletrônica de transmissão após contrastação negativa.....	17
Figura 2 – Esquema da estrutura do rotavírus e dos segmentos de RNAdf.....	18
Figura 3 - Representação esquemática dos principais mecanismos de indução da diarreia e vômito por rotavírus.....	24
Figura 4 - Figura representativa do evento de reestruturação em rotavírus do grupo A.28	
Figura 5 - Esquema das vias de biossíntese dos antígenos de grupo sanguíneo do tipo 1 humanos (HBGA).....	34
Figura 6 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de nucleotídeos de VP7 de cepas de rotavírus, Região Metropolitana de Vitória, ES.....	51
Figura 7 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de nucleotídeos de VP4 de cepas de rotavírus, Região Metropolitana de Vitória, ES.....	55
Figura 8 - Alinhamento de sequências de aminoácidos de VP8* de rotavírus de estirpes do estudo em comparação às sequências de VP8* das cepas vacinais RV1 e RV5 e de outras estirpes isoladas no mundo.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do número de amostras fecais e “swabs” bucais obtidos de crianças com diarreia por local de coleta.....	42
Tabela 2 - Frequência de crianças infectadas por rotavírus de acordo com a idade.....	43
Tabela 3 - Total de amostras e frequência de rotavírus por local de coleta.....	43
Tabela 4 - Total de amostras coletadas por ano e número de casos positivos de rotavírus.....	43
Tabela 5 - Informações clínicas de crianças infectadas por rotavírus em comparação ao grupo controle negativo.....	44
Tabela 6 - Frequência dos genótipos G e P de rotavírus detectados nas crianças com diarreia de acordo com os locais de coleta.....	45
Tabela 7 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre algumas sequências de VP7 genótipo rotavírus G12 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências de G12 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.....	48
Tabela 8 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP7 genótipo rotavírus G3 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências G3 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.....	49
Tabela 9 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP7 genótipo rotavírus G2 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências G2 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.....	50

Tabela 10 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre algumas sequências de VP4 genótipo rotavírus P[8] do estudo (em realce cinza) em comparação às sequências de VP4 de RV1 e RV5 e sequências P[8] de estirpes coletadas no Brasil e no mundo.....53

Tabela 11 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP4 genótipo P[4] de rotavírus do estudo (em realce cinza) em comparação às sequências de VP4 de RV1 e RV5 e sequências de P[4] de estirpes coletadas no Brasil e no mundo.54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool”

ES – Espírito Santo

EDIM – “Epizootic diarrhea of infant mice”

FUT-2 - Fucosiltransferase-2

FUT-3 - Fucosiltransferase-3/4

GAL – Galactose

GEA – Gastroenterite aguda

GlcNAc - N-Acetilglicosamina

HBGA – Antígenos de grupo sanguíneo (do inglês “Histo-Blood Group Antigens”)

HINSG - Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora Glória

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

IgA – Imunoglobulina A

LabViG - UFES - Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa da Universidade Federal do Espírito Santo

LACEN – ES - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo

Le - Lewis

NCDV – “Nebraska calf diarrhea vírus”

nt - Nucleotídeos

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAPS - Pronto Atendimento da Praia do Suá

PASP - Pronto Atendimento de São Pedro

pb – Pares de base

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

RCWG – “Rotavirus Classification Working Group”

RVA – Rotavírus do Grupo A

RVB – Rotavírus do Grupo B

RVC – Rotavírus do Grupo C

RVH – Rotavírus do Grupo H

RNAdf - RNA de dupla fita

SA11 - “Simian agent 11”

SNP – “Single Nucleotide Polymorphisms”

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISAO DE LITERATURA	16
2.1 BREVE HISTÓRICO	16
2.2 ESTRUTURA DO VÍRION	18
2.3 CLASSIFICAÇÃO	19
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE	22
2.5 EPIDEMIOLOGIA DOS ROTAVÍRUS.....	25
2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DE ROTAVÍRUS	27
2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO.....	30
2.8 RELAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO COM SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR NOROVÍRUS E ROTAVÍRUS..	34
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVOS GERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5 DADOS COMPLEMENTARES	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
5.1.1 <i>Obtenção de amostras e aspectos éticos do estudo</i>	41
5.1.2 <i>Distribuição de amostras de fezes e casos de rotavírus de acordo com a idade das crianças infectadas, local e ano de coleta</i>	43
5.1.3 <i>Principais sinais e sintomas clínicos</i>	44
5.2 GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS.....	44
5.2.1 <i>Distribuição dos genótipos de rotavírus de acordo com o mês de coleta</i>	45
5.2.2 <i>Sequenciamento e análise filogenética de VP4 e VP7</i>	46
5.3 SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE P[8] e P[4] DE ROTAVÍRUS LIGADORAS DE GLICANOS	57
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	66

ANEXO 1	90
ANEXO 2	91
ANEXO 3.....	92
ANEXO 4.....	106

1 INTRODUÇÃO

Apesar do esforço global na redução de mortes associadas à doença diarreica nos últimos 25 anos, ela ainda permanece como uma das principais causas de morte entre as crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que aproximadamente 450.000 crianças nessa faixa etária morrem anualmente no mundo devido às doenças diarreicas, sendo a quinta principal causa de morte (GBD, 2018; TROEGER et al. 2018).

Os agentes etiológicos virais, particularmente os rotavírus e os norovírus, são os principais responsáveis no mundo pela diarreia (BÁNYAI et al. 2018). O rotavírus do grupo A (RVA) responde pela maior parte dos casos de hospitalização e de morte por diarreia. Estima-se que em 2016 o rotavírus foi responsável por 128.500 mortes entre crianças menores de 5 anos de idade no mundo, com 104.733 mortes somente na África Subsaariana (GBD, 2018). Os norovírus, por sua vez, são os principais agentes de gastroenterite aguda esporádica e de surtos no mundo em indivíduos de todas as idades e estima-se que resultam em aproximadamente 70.000 a 200.000 mortes anualmente. (AHMED et al. 2014; BÁNYAI et al. 2018).

Classificados na família *Reoviridae*, os rotavírus são vírus de simetria icosaédrica, formado por três capas proteicas concêntricas. As proteínas VP4 e VP7, que compõem o capsídeo mais externo, constituem a base da classificação binária destes vírus em 51 genótipos P (de protease sensível) e 36 genótipos G (de glicoproteína), respectivamente (MATTHIJNSSENS et al. 2011; RCWG, 2020). Dos genótipos que infectam humanos, as combinações G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G2P[4], por serem as mais comuns no mundo, formaram a base para a constituição das duas principais vacinas de uso oral disponíveis, ambas compostas por vírus atenuado. Uma monovalente, denominada RV1 (P[8]G1 – humana - Rotarix® - GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium), e a outra pentavalente, denominada RV5 (P1A[8], G1, G2, G3, G4 – humana-bovina - RotaTeq® Merck and Co; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) (GREENBERG; ESTES, 2009; BURKE et al. 2019). A vacinação para rotavírus foi instituída no Brasil em março de 2006 pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), primeiro país no mundo a fazê-lo em âmbito nacional (PEREIRA et al. 2020). Atualmente, 107 países introduziram a

vacinação para rotavírus em seus programas nacionais de imunização, embora ainda 41% de todas as crianças não têm acesso às vacinas contra o rotavírus (ROTA, 2020).

Ambas as vacinas têm demonstrado redução efetiva nos casos graves, nas hospitalizações e no número de mortes associadas ao rotavírus em diversos países (CARMO et al. 2011; CHAVERS et al. 2018; BURNETT; PARASHAR; TATE, 2020; PEREIRA et al. 2020). Entretanto, o impacto da vacinação em massa e ainda para um vírus que possui múltiplos genótipos é sempre uma preocupação e exige constante vigilância para detecção de: (i) modificação na prevalência entre os genótipos mais comuns, favorecendo aquele para o qual a vacina confere menor proteção e (ii) emergência de genótipos incomuns que podem prevalecer na população, conforme observado recentemente com o aumento da prevalência do genótipo emergente “equine-like” G3P[8] no mundo assim como no Brasil (LUCHS et al. 2019; GUTIERREZ et al. 2020).

Embora sejam altamente eficazes na prevenção de doença grave por rotavírus em países desenvolvidos, as vacinas RV1 e RV5 apresentam menor eficácia em países em desenvolvimento, principalmente da Ásia e África (ZAMAN et al. 2010; MADHI et al. 2010; ARMAH et al. 2010; JONESTELLER et al. 2017). O entendimento sobre a susceptibilidade do hospedeiro ao rotavírus, e conseqüentemente à estirpe vacinal, veio da recente descoberta de que estes vírus reconhecem os antígenos de grupo sanguíneo (HBGAs) como receptores. Como vem sendo investigado, o estudo de HBGA em distintos grupos populacionais e étnicos pode fornecer respostas para a diferença na eficácia da vacina observada em diferentes países (SHARMA et al. 2020).

Os HBGAs são glicoconjugados não sialilados, altamente polimórficos, expressos na superfície de hemácias e de células epiteliais (p.ex.: intestino), e também presentes em fluidos biológicos como saliva. Sua síntese ocorre pela adição sequencial de monossacarídeos a precursores dissacarídeos por enzimas glicosiltransferases tais como fucosiltransferase-2 (FUT-2), fucosiltransferase-3/4 (FUT-3) e A e B transferases (genes ABH), que determinam os fenótipos de HBGA Secretor, Lewis e ABH, respectivamente (LE PENDU; RUVOËN-CLOUET et al. 2020).

Embora a susceptibilidade genética à infecção por norovírus mediada pelo polimorfismo de HBGA seja conhecida há décadas, somente recentemente, após a descoberta da ligação do domínio VP8* da proteína VP4 do rotavírus aos HBGAs, que esse fenômeno começou a ser estudado para esse vírus (MARIONNEAU et al. 2002; HU et al. 2012; HUANG et al. 2012). Assim como observado para o norovírus, os estudos epidemiológicos tem demonstrado associação entre o fenótipo secretor de HBGA e a infecção por rotavírus, sobretudo por genótipo P[8] e, ao contrário, associação entre o polimorfismo de HBGA, resultando na mutação de *FUT-2* e fenótipo não-secretor, e ausência de gastroenterite por rotavírus (IMBERT-MARCILLE et al. 2014; PAYNE et al. 2015; ZHANG et al. 2016; PÉREZ-ORTÍN et al. 2019). Entretanto, resultados conflitantes foram obtidos em um estudo realizado na Tunísia que mostrou que rotavírus P[8] infecta tanto indivíduos secretores como não secretores, e mais recentemente em Bangladesh, onde crianças não secretoras não foram protegidas de diarreia causada por rotavírus P[8] (AYOUNI et al. 2015; LEE et al. 2018). Esta discrepância indica a necessidade de realização de mais estudos populacionais com o intuito de melhor entender o papel dos fenótipos de HBGA do hospedeiro na infecção por rotavírus. Além disso, os resultados observados nesses países não podem ser extrapolados para indivíduos de todas etnias de modo que estudos em populações distintas devem ser conduzidos para determinar até que ponto a susceptibilidade baseada no status secretor e o polimorfismo de *FUT-2* e *FUT-3* podem variar entre diferentes grupos étnicos.

2 REVISAO DE LITERATURA

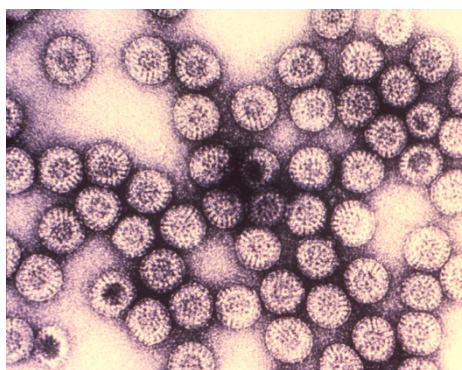
2.1 BREVE HISTÓRICO

Por séculos, a diarreia aguda foi umas das principais causas de morte entre crianças pequenas e, até 1973, nenhum agente etiológico viral pôde ser identificado em aproximadamente 80% dos pacientes admitidos aos hospitais com diarreia aguda grave (BISHOP, 2009).

Em 1973, Bishop e outros, em um hospital em Melbourne, Austrália, em um projeto que examinava cortes ultrafinos de mucosa duodenal de crianças com gastroenterite aguda, utilizando microscopia eletrônica, observaram a presença de abundantes partículas virais

nas células epiteliais das vilosidades (BISHOP et al. 1973). Também em 1973, Flewett e outros, na Inglaterra, identificaram partículas virais semelhantes ao achado de Bishop em fezes de crianças hospitalizadas com diarreia. O vírus foi identificado como sendo uma partícula reovírus-“like”/orbivírus-“like”, com grande semelhança a vírus previamente envolvidos em casos de diarreia neonatal em camundongos e em bezerros (BISHOP et al. 1973; FLEWETT et al. 1973).

A partícula viral recém descoberta foi inicialmente referida por várias denominações tais como reovírus-“like”, orbivírus-“like”, duovírus, vírus da gastroenterite infantil, ou simplesmente como um “novo” vírus. A estrutura do vírion em forma de roda que era vista por microscopia eletrônica foi responsável pela escolha do nome rotavírus (do latim *rota*, para roda) (Figura 1) (BISHOP, 2009). Os rotavírus humanos foram rapidamente associados a descrições precedentes na literatura, como a de vírus idênticos causadores de diarreia grave em camundongos recém-nascidos (vírus EDIM, “epizootic diarrhea of infant mice”), em bezerros recém-nascidos (NCDV, “nebraska calf diarrhea vírus”) e em vírus denominados SA11 (“simian agente” 11), identificados a partir de um “swab” retal de um macaco saudável (ADAMS; KRAFT, 1963; MALHERBE; STRICKLAND-CHOMLEY, 1967; MEBUS et al. 1969). Após esta descoberta logo se tornou evidente que os rotavírus eram uma das principais causas de diarreia aguda grave em bebês e crianças menores de cinco anos de idade no mundo e em diversas espécies de mamíferos e aves.

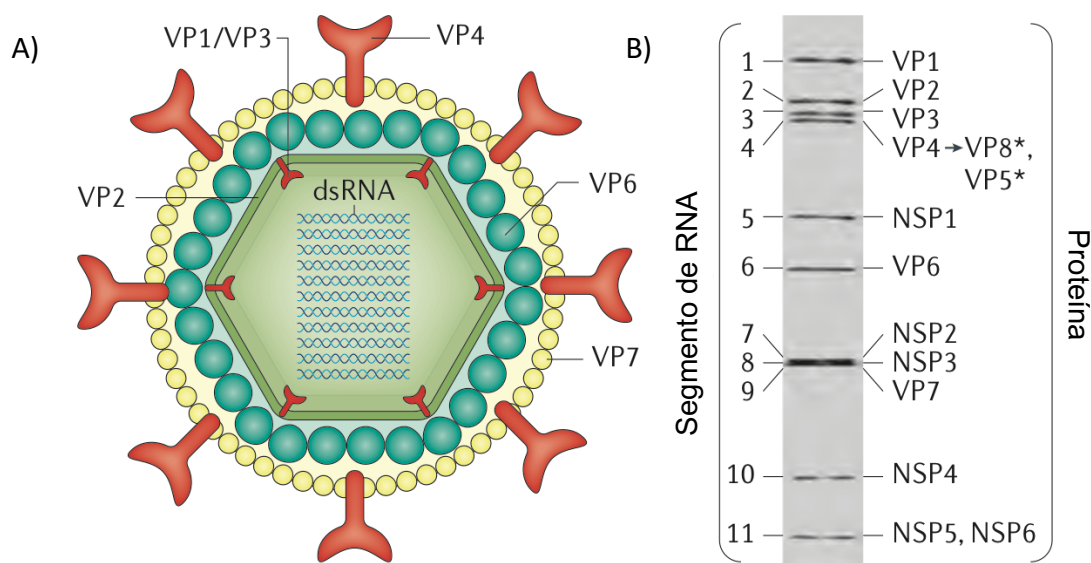


Fonte: CDC, 1978.

Figura 1. Estrutura do rotavírus em forma de roda vista por microscopia eletrônica de transmissão após contrastação negativa.

2.2 ESTRUTURA DO VÍRION

A partícula viral de rotavírus apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro, sendo desprovida de envelope. Possui capsídeo de simetria icosaédrica e uma complexa arquitetura composta de três camadas de proteínas concêntricas, que envolvem um genoma de 11 segmentos de RNA de dupla fita (RNAdf), cujos tamanhos variam de 667 a 3.302 pares de base (pb) (Figura 2). Cada um dos 11 segmentos gênicos codifica para uma proteína, exceto o segmento 11, que codifica para duas proteínas não estruturais diferentes (NSP5 e NSP6). Seis dos segmentos codificam proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e cinco segmentos gênicos codificam proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5/NSP6) (CRAWFORD et al. 2017) (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Crawford et al. (2017).

Figura 2. Esquema da estrutura do rotavírus e dos segmentos de RNAdf. A) Figura esquemática da tripla camada proteica da partícula do rotavírus. Esta estrutura consiste da camada interna do capsídeo (VP2), camada proteica intermediária (VP6) e o capsídeo externo (VP7 e VP4). B) Perfil de migração eletroforética dos 11 segmentos de RNAdf e as proteínas correspondentes que são codificadas.

As três camadas proteicas do vírion são compostas pelas proteínas VP2, VP6, VP4 e VP7. A camada mais interna, em torno do genoma, denominada cerne ou core, é formada pela

VP2, que interage com VP1 e VP3. As proteínas VP1 (RNA polimerase-RNA dependente – RdRp) e VP3 (enzima responsável pelo “capping” do RNAm) encontram-se diretamente ligadas aos segmentos de RNA genômico e formam o complexo da polimerase. Sugere-se que uma cópia de VP1 e VP3 está associada a cada um dos 11 segmentos de RNA. A camada intermediária corresponde ao capsídeo intermediário e é formada por VP6. Esta proteína é a mais abundante do vírion (devido a sua alta massa molecular e número de cópias) sendo o principal componente estrutural. Desempenha papel central na estrutura da partícula viral devido às suas interações com as proteínas do capsídeo externo e com VP2. O capsídeo externo é constituído pelas proteínas VP4 e VP7. A VP7, principal constituinte da camada externa, é uma glicoproteína cálcio-dependente que interage com VP4 e VP6, auxiliando na manutenção da estrutura do vírion. Além disso, possui epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes no hospedeiro. A proteína VP4 possui 60 espículas por partícula que estão inseridas no capsídeo externo em contato com as moléculas de VP7 (PESAVENTO et al. 2006; MCCLAIN et al. 2010). Esta proteína apresenta funções biológicas importantes como adesão e internalização aos enterócitos, atividade hemaglutinante e virulência (DUNN et al. 1995; LUDERT et al. 1996).

O tratamento da partícula viral com tripsina resulta na clivagem da proteína VP4 em dois polipeptídios, VP8* e VP5*, que permanecem ligadas ao vírion não covalentemente. O peptídeo VP8* forma a porção globular da espícula e é derivado da porção aminoterminal de VP4, atuando na adsorção da partícula viral a receptor da célula hospedeira. Estudos recentes demonstram que o domínio VP8* de VP4 do rotavírus se liga à célula hospedeira por meio de moléculas de sialoglicanos como os gangliosídeos GM1 e GD1a e a antígenos de grupo sanguíneo (HBGA) (LÓPEZ; ARIAS, 2004; HU et al. 2012; ARIAS et al. 2015).

2.3 CLASSIFICAÇÃO

Baseado na similaridade entre a estrutura do capsídeo, organização do genoma e estratégias de replicação, os rotavírus foram classificados em um gênero separado (*Rotavirus*) dentro da família *Reoviridae*. Diferenças nas propriedades antigênicas,

sequências gênicas e padrão do genoma ou perfil do RNA de rotavírus são utilizados como base para uma classificação mais detalhada dentro do gênero (FIELDS, 2007).

Atualmente os rotavírus são classificados em dez diferentes espécies (A-J) baseado na sequência e diferenças antigênicas da proteína VP6 (ICTV, 2020). Estas “espécies de rotavírus” são comumente referidas como “grupos de rotavírus”. Os rotavírus pertencentes às espécies A, B, C e H (RVA, RVB, RVC e RVH, respectivamente) estão associadas à gastroenterite aguda em humanos e animais, enquanto que os rotavírus das espécies D, E, F e G foram até então detectados somente em animais, principalmente em aves (MATTHIJNSSENS et al. 2011). As duas mais novas espécies I e J de rotavírus foram identificadas em fezes de cães na Hungria e em morcegos na Sérvia, respectivamente (MIHALOV-KOVÁCS et al. 2015; BÁNYAI et al. 2017).

Os rotavírus do grupo A são epidemiologicamente mais importantes que os demais grupos sendo responsáveis por mais de 90% das infecções em humanos (BÁNYAI et al. 2018). Este grupo tem sido classificado com base em: i) propriedades antigênicas de VP6, VP7 e VP4 (subgrupos, sorotipos G e sorotipos P, respectivamente); ii) padrão de migração dos segmentos de RNA genômico quando submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida, também chamado de eletroferotipo (longo, curto, supercurto ou eletroferotipo atípico); iii) padrão de hibridização de RNA genômico total (genogrupos); e por fim iv) sequência nucleotídica dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7, determinando os genótipos P e G, respectivamente. Com a disponibilidade e facilidade de aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase e de sequenciamento, a caracterização antigênica foi sendo substituída pelo sistema de classificação baseado nos genótipos P e G (MATTHIJNSSENS et al. 2008a; 2011).

Em 2011, um novo sistema de classificação de rotavírus foi proposto pelo “Rotavirus Classification Working Group” (RCWG), baseado não apenas na classificação binária dos genes VP4 e VP7, mas também na análise da sequência nucleotídica de todos os demais nove segmentos gênicos do RNAdf (Quadro 1) (MATTHIJNSSENS et al. 2008b; MATTHIJNSSENS et al. 2011). Este novo sistema designa um genótipo para cada um dos 11 segmentos de RNA genômico do rotavírus, no qual as notações Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx são utilizadas para os genes que codificam VP7-VP4-VP6-

VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, respectivamente (MATTHIJNSSENS et al. 2011). A letra “x” indica o número (algarismo arábico) do genótipo. Os números referentes aos genótipos P devem ser escritos entre colchetes com o intuito de não confundir com a classificação dos sorotipos P usada anteriormente, uma vez que estas classificações não são correspondentes. Baseado nesta classificação, a maioria dos rotavírus humanos detectados no mundo pertencem às constelações genótípicas denominadas “Wa-like” (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) e “DS-1-like” (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), também chamadas de genótipo 1 e 2, respectivamente. Uma terceira constelação genotípica, observada em menor escala, é referida como “AU-1 like” (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) (MATTHIJNSSENS; VAN RANST, 2012; MCDONALD et al. 2009). Com base nesta classificação, foram descritos até o momento 36 G, 51 P, 26 I, 22 R, 20 C, 20 M, 31 A, 22 N, 22 T, 27 E, 22H (RCWG, 2020). A utilização deste novo sistema de classificação tem permitido a análise de eventos de reestruturação (“reassortment”) entre cepas humanas e de origem animal ou com cepas vacinais, além de conhecer a origem evolucionária das cepas, elucidando se os segmentos de RNA são originados de cepas protótipos ou possuem origens diferentes (GHOSH; KOBAYASHI, 2011).

Quadro 1. Genótipos de rotavírus e denominação com base nos 11 segmentos gênicos do vírus com respectivos valores de corte da percentagem de identidade de nucleotídeos (nt).

Gene	Valor de corte da identidade de nucleotídeos (%)	Genótipos	Denominação dos genótipos
VP1	83	22R	<u>R</u> NA polimerase-RNA dependente
VP2	84	20C	Proteína do <u>C</u> erne
VP3	81	20M	<u>M</u> etiltransferase
VP4	80	51P	Sensível à <u>P</u> rotease
VP6	85	26I	Capsídeo <u>I</u> nterno
VP7	80	36G	<u>G</u> licoproteína
NSP1	79	31A	<u>A</u> ntagonista do Interferon
NSP2	85	22N	<u>N</u> TPase

NSP3	85	22T	Potencializador da <u>T</u> radução
NSP4	85	27E	<u>E</u> nterotoxina
NSP5/NSP6	91	22H	Fosfoproteína (“ <u>p</u> Hosphoprotein”)

Fonte: Adaptado de Matthijnssens et al. (2008b); RCWG, 29 maio. 2018.

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE

A infecção por rotavírus em crianças pode induzir um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde a uma infecção subclínica ou branda com diarreia aquosa de duração limitada, a uma diarreia grave com vômitos e febre que podem resultar em desidratação com choque, desequilíbrio eletrolítico e morte (BÁNYAI et al. 2018). O período de incubação em crianças é de 24 a 78 horas após a infecção e em adultos entre um a quatro dias. Em média, a infecção por rotavírus dura entre três a sete dias. Entretanto, casos mais graves ou infecção em indivíduos imunocomprometidos podem durar algumas semanas a meses, ou até mesmo anos (BERNSTEIN, 2009; BÁNYAI et al. 2018).

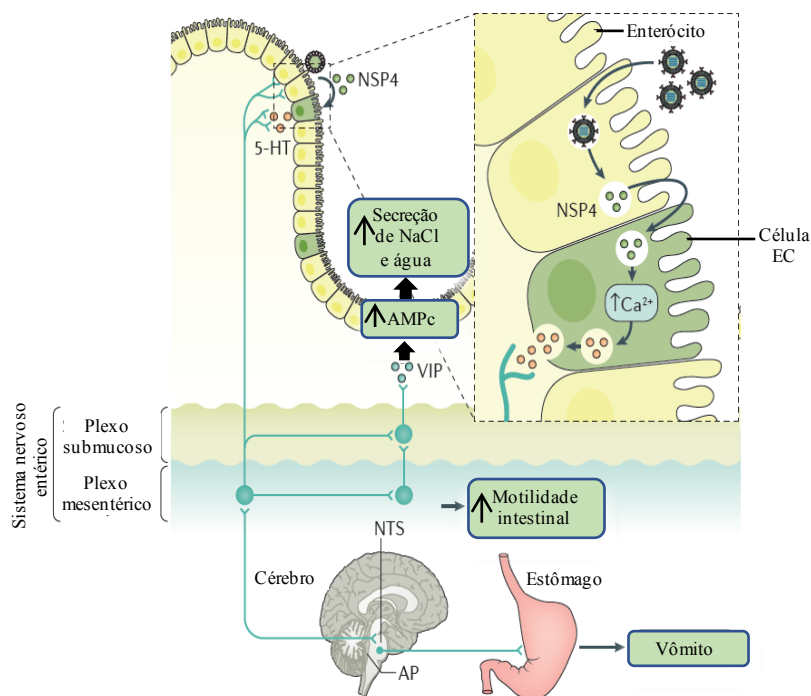
O resultado da infecção é influenciado tanto por fatores virais quanto por fatores do hospedeiro. O principal fator do hospedeiro que afeta o curso da infecção é a idade. Desta forma, crianças menores ou iguais a três meses de idade infectadas por rotavírus raramente desenvolvem sintomas clínicos. Esta proteção é mediada principalmente pela transferência transplacentária de anticorpos maternos. A redução do título destes anticorpos coincide com a idade de maior susceptibilidade das crianças ao rotavírus (3 a 24 meses) (GREENBERG; ESTES, 2009; RAY et al. 2007).

O rotavírus é transmitido predominantemente pela via fecal-oral, principalmente pelo contato próximo pessoa a pessoa, e contato com fômites contaminados, especialmente em hospitais e serviços de cuidado ambulatoriais. A transmissão do rotavírus por gotículas no ar tem sido sugerida para explicar a rápida aquisição de anticorpos anti-rotavírus nos primeiros três anos de vida, independentemente das condições de higiene e sanitárias (BUTZ et al. 1993; ANSARI et al. 1991). Entretanto, esta hipótese ainda não foi provada. Crianças infectadas ou sintomáticas começam a excretar rotavírus nas fezes antes do

início dos sintomas e podem excretar mais do que 10^{10} - 10^{11} partículas de rotavírus por grama de fezes, sendo necessárias menos de 10 partículas para infectar um hospedeiro susceptível (BISHOP, 1996). A grande quantidade de vírus excretada é provavelmente uma das razões para a dificuldade em reduzir significativamente a incidência da doença nos países desenvolvidos, mesmo após melhoras nas condições de higiene (GREENBERG; ESTES, 2009).

O rotavírus infecta e se replica nos enterócitos maduros não proliferativos na porção média e no ápice das vilosidades e nas células enteroendócrinas do intestino delgado (SAXENA et al. 2015; HAGBOM et al. 2011; LUNDGREN; SVENSSON, 2001). A diarreia causada pelo rotavírus é não-inflamatória e envolve mecanismos de má absorção e secretório, detalhados a seguir: (i) “diarreia osmótica” devido à má absorção, secundária aos danos nos enterócitos ou morte celular, ou à diminuição das funções epiteliais de absorção e (ii) “diarreia secretória” devido aos efeitos da proteína NSP4 e ativação do sistema nervoso entérico (BALL et al. 1996). Além disso, a secreção de 5-hidroxitriptamina (5-HT; também conhecida como serotonina) mediada pela infecção por rotavírus pode ativar vias de sinalização que podem induzir a diarreia e vômitos (HAGBOM et al. 2011).

Os principais mecanismos envolvidos na indução da diarreia e vômitos por rotavírus são descritos na Figura 3.



Fonte: Adaptado de Crawford et al. (2017)

Figura 3. Representação esquemática dos principais mecanismos de indução da diarreia e vômito por rotavírus. A proteína não estrutural 4 (NSP4) é liberada por enterócitos infectados e estimula o aumento dos níveis de cálcio intracelular que induz as células enterocromafins (EC, um tipo de célula enteroendócrina) a liberar a 5-hidroxitriptamina (5-HT), um neurotransmissor que regula a motilidade gastrointestinal e induz a náusea e o vômito. A liberação de 5-HT pode induzir a diarreia devido à ativação de receptores de 5-HT nos nervos aferentes primários que compõem o plexo mesentérico. A ativação dos nervos do plexo mesentérico aumenta a motilidade intestinal e ativa os nervos que compõem o plexo submucoso, os quais estimulam a liberação do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) de terminações nervosas adjacentes às células da cripta. Estes eventos levam à diarreia pelo incremento dos níveis de cAMP, que resulta na secreção de cloreto de sódio (NaCl) e água no lúmen intestinal. Além disso, a NSP4 secretada de enterócitos infectados se liga a células do epitélio intestinal e sinaliza por meio da fosfolipase C um aumento dos níveis de cálcio intracelular, os quais ativam canais de cloreto dependentes de cálcio. Ativação destes canais causa secreção excessiva de íons cloreto no lúmen intestinal, criando um gradiente osmótico que facilita o transporte de água dentro do lúmen, levando à diarreia secretória (não demonstrado na figura). A infecção por rotavírus e liberação do 5-HT mediada por NSP4 também ativa os nervos vagais que se ligam a regiões do cérebro associados à náusea e vômito.

2.5 EPIDEMIOLOGIA DOS ROTAVÍRUS

Os rotavírus são ubíquos e praticamente todas as crianças entre três e cinco anos de idade, em âmbito global e anterior à instituição da vacinação, já apresentaram pelo menos um episódio de diarreia por esse vírus (GURWITH et al. 1981; VELAZQUEZ et al. 1996). As infecções por rotavírus são a principal causa de diarreia aguda grave em crianças menores de cinco anos de idade mundialmente e dados de 2003 estimam que 114 milhões de casos de infecção por rotavírus foram reportados em crianças dessa faixa etária no mundo, dos quais 24 milhões necessitaram de atendimentos ambulatoriais e 2,3 milhões requereram hospitalização (PARASHAR et al. 2003). Antes da introdução das vacinas, a gastroenterite causada por rotavírus causava mais de 500.000 mortes em crianças menores de cinco anos de idade no mundo anualmente (TATE et al. 2012). Mesmo na era pós-vacinal, o rotavírus permanece como o agente etiológico de diarreia que mais mata crianças menores de cinco anos de idade no mundo. Em 2016, estima-se que 128.515 crianças abaixo de cinco anos de idade no mundo morreram devido à infecção por rotavírus (TROEGER et al. 2018).

Embora a prevalência da infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas com diarreia seja similar mundialmente (~30 a 50%), mais de 90% das crianças com doença fatal por rotavírus vivem em países em desenvolvimento (principalmente da África Subsaariana e continente Asiático), o que é justificado provavelmente devido ao acesso limitado a serviços de saúde, indisponibilidade da terapia de reidratação e a uma alta prevalência de comorbidades, tal como desnutrição, nestas localidades (TATE et al. 2016).

A infecção por rotavírus demonstra um padrão sazonal distinto em regiões de clima temperado com picos epidêmicos ocorrendo predominantemente no outono e meses de inverno do ano. A natureza sazonal não é universal e em geral em países de clima tropical a infecção ocorre ao longo de todo o ano, embora, em algumas ocasiões, um aumento é registrado durante os meses mais frios e secos do ano (LEVY et al. 2009). Observa-se ainda uma sazonalidade que se associa fortemente com o nível de desenvolvimento econômico de um país, sendo observado um padrão de doença mais sazonal em países desenvolvidos do que subdesenvolvidos (PATEL et al. 2013).

Dentre os 36 genótipos G e 51 genótipos P de rotavírus identificados, globalmente seis genótipos G (G1, G2, G3, G4, G9 e G12) e três genótipos P (P[4], P[6] e P[8]) predominam (GENTSCH et al. 2005; SANTOS; HOSHINO, 2005; MATTHIJNSSENS et al. 2009).

Em 30 anos de período pré-vacinal, mais de dois terços das infecções por rotavírus em âmbito global foram atribuídas a G1P[8] e 20% devido a G2P[4], G3P[8] e G4P[8] (SANTOS; HOSHINO, 2005). Observa-se, no entanto, variação nos genótipos circulantes por ano e região. Na África, por exemplo, G1P[8] corresponde a apenas 23% das infecções e na Ásia a 30% (SEHERI et al. 2017; GIRI et al. 2018).

Um estudo retrospectivo recente de epidemiologia molecular avaliou a distribuição dos genótipos de rotavírus no Brasil antes (1996 a 2005) e após a introdução da vacina RV1 (2006-2017) (CARVALHO-COSTA et al. 2019). A circulação dos genótipos de rotavírus apresentou um padrão cíclico com decréscimo significativo de detecção de P[8] no período pós-vacinal e emergência de G2P[4] em 2005 com aumento desse genótipo na era pós-vacinal e disseminação de G12P[8] em 2014-2015 e de G3P[8] em 2017 (Quadro 2). Segundo os autores, neste cenário de vacinação para rotavírus no Brasil há necessidade de uma vigilância viral contínua com o intuito de monitorar a circulação de genótipos distintos de rotavírus e outros vírus entéricos como o norovírus (CARVALHO-COSTA et al. 2019).

Quadro 2. Taxa de detecção dos distintos genótipos de rotavírus no período pré e pós vacinal no Brasil, 1996-2017.

Genótipos de rotavírus	Período pré-vacinal (1996 – 2005)	Período pós-vacinal (2006-2017)
G1P[8] / G1P[NT]^b	417/855 (48.8%)	118/1835 (6.4%)
G2P[4] / G2P[NT]	47/855 (5.5%)	838/1835 (45.7%)
G3P[8] / G3P[NT]	55/855 (6.4%)	253/1835 (13.8%)
G9P[8] / G9P[NT]	238/855 (27.8%)	152/1835 (8.3%)
G12P[8] / G12P[NT]	-	249/1835 (13.6%)

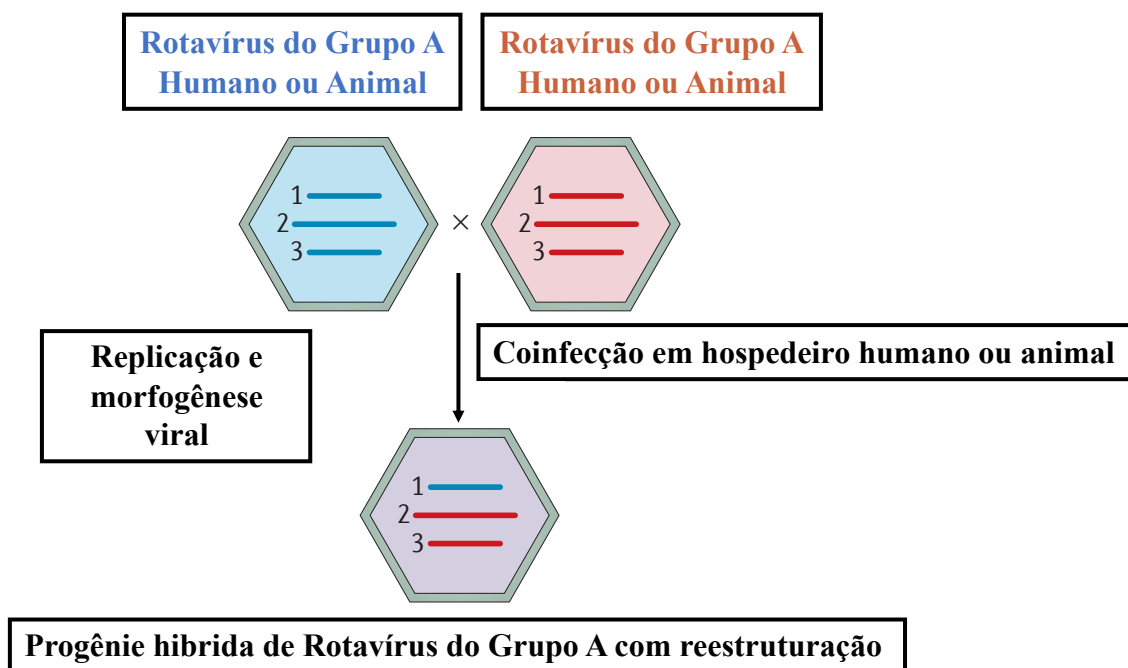
Fonte: Adaptado de Carvalho-Costa et al. (2019). ^bNão tipado.

2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DE ROTAVÍRUS

A heterogeneidade das cepas humanas de rotavírus pode influenciar o sucesso dos programas de vacinação e esta diversidade pode ser gerada e aumentada principalmente por quatro diferentes mecanismos: 1) acúmulo de mutações pontuais (“genetic drift”); 2) reestruturações dos 11 segmentos gênicos (“genetic shift” ou “reassortment”); 3) rearranjos gênicos (deleções, duplicações e inserções) e 4) recombinação intragênica (MATTHIJNSSENS et al. 2009; GHOSH; KOBAYASHI, 2011).

A ocorrência de mutações pontuais é um fenômeno frequente em rotavírus, devido à natureza da RNA polimerase RNA-dependente. As taxas de mutações de rotavírus na comunidade foram reveladas por Matthijnssens e colaboradores (2010) ao estudar as sequências de VP7 de dois genótipos emergentes, G9 e G12. As taxas de mutações estimadas foram $1,9 \times 10^{-3}$ e $1,7 \times 10^{-3}$ (substituições de nucleotídeo/sítio/ano), respectivamente, valores comparáveis aos obtidos por outros vírus de RNA (MATTHIJNSSENS et al. 2010; GHOSH; KOBAYASHI, 2011). Após a introdução da vacina para rotavírus, surgiu a preocupação de que o acúmulo de mutações pontuais nos sítios antigênicos de VP7 e VP4 em cepas selvagens de rotavírus poderia resultar em diminuição da eficácia das vacinas. Entretanto, um estudo conduzido no Brasil que analisou cepas de rotavírus G1P[8] isoladas de diferentes estados brasileiros antes (1996 a 2006) e após a introdução da vacina RV1 (2006 – 2013), concluiu que as diferenças encontradas em sítios antigênicos de VP7 e VP8* não estavam associadas ao uso extensivo da vacina RV1 e que algumas substituições de aminoácidos detectadas após a introdução da vacina estavam também presentes em cepas isoladas nas décadas de 1980 e 1990 (SILVA et al. 2015). Os resultados desse estudo são similares aos achados de Hemming e Vesikari (2013), que demonstraram em um período de estudo de 20 anos que a vacinação em massa com a vacina RV5 na Finlândia não influenciou a diversidade genética das proteínas de VP7 e VP4 de cepas de G1P[8] (HEMMING; VESIKARI, 2013). Portanto, até o momento não há evidências que suportam a hipótese de que a vacinação para rotavírus leva a um aumento de cepas circulantes de rotavírus com “drift” sendo mais provável que as diferenças de aminoácidos em cepas de rotavírus sejam resultado do processo evolucionário normal (BUCARDO; NORDGREN, 2015).

A reestruturação é uma característica comum aos vírus segmentados de RNA como rotavírus e consiste na troca de segmentos gênicos entre dois ou mais vírus similares durante a coinfeção de uma única célula hospedeira (Figura 4). No caso de rotavírus, esta troca ocorre entre dois ou mais segmentos gênicos de duas cepas (humana-humana, humana-animal ou animal-animal) gerando uma progênie híbrida contendo segmentos provenientes das duas cepas de origem (GHOSH; KOBAYASHI, 2011).



Fonte: Adaptado de McDONALD et al. (2016).

Figura 4. Figura representativa do evento de reestruturação em rotavírus do grupo A.

A incidência da reestruturação é influenciada pela frequência de coinfeções e pela diversidade genética das cepas circulantes de rotavírus na população. Em países em desenvolvimento, onde esses fatores coexistem, a ocorrência de eventos de reestruturação é maior (taxas maiores que 20%) do que em países desenvolvidos (taxas menores do que 5%), provavelmente devido a fatores ambientais e ligados ao hospedeiro como precárias condições de saneamento e higiene, imunodeficiências, coinfeções com parasitos, além do estreito contato entre o homem e os animais. Todos esses elementos proporcionam a ocorrência de infecções mistas e, conseqüentemente, aumentam a chance dos vírus sofrerem reestruturações (COOK et al. 2004; GHOSH; KOBAYASHI, 2011; PATTON, 2012). Numerosos estudos de epidemiologia molecular revelaram que algumas cepas de

rotavírus humanas podem ter sido originadas de reestruturações entre cepas humanas e animais de rotavírus (SANTOS; HOSHINO, 2005; MATTHIJNSSENS et al. 2008a; MARTELLA et al. 2010). Além disso, estudos de vigilância de rotavírus demonstraram que alguns genótipos emergentes que apresentaram disseminação global, como o G9, e mais recentemente o genótipo G3P[8] “equine-like”, foram gerados por este mecanismo de evolução (RAMACHANDRAN et al. 2000; LAIRD et al. 2003; MATTHIJNSSENS et al. 2010; ARANA et al. 2016; KIKUCHI et al. 2018).

De acordo com Bucardo e Nordgren (2015), tendo em vista a habilidade de rotavírus de realizar eventos de reestruturação, é possível que a utilização ampla das vacinas RV1 e RV5 possa levar à emergência de cepas vacinais/selvagens reestruturadas. Evidências deste fenômeno foram observadas pela primeira vez em um estudo na Nicarágua, onde cepas de rotavírus G1P[8] isoladas de duas crianças vacinadas que apresentaram gastroenterite grave apresentaram a sequência do gene NSP2 idêntica ao gene NSP2 bovino da RotaTeq (BUCARDO et al. 2012). De maneira similar, esse tipo de reestruturação foi também observado no Brasil, onde uma cepa de rotavírus G1P[6] isolada de uma criança vacinada com RV1 continha o gene VP1 provavelmente derivado de uma cepa vacinal RV1 (ROSE et al. 2013).

Os rearranjos representam alterações na sequência de um único segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação, causando uma mudança radical no tamanho de um segmento de RNA, que pode ser geralmente evidenciada por meio da visualização do perfil eletroforético dos rotavírus em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Este tipo de mecanismo ocorre principalmente com genes não estruturais de rotavírus e foi descrito em rotavírus isolados de crianças imunodeficientes e de humanos e animais imunocompetentes. Entretanto, a contribuição deste mecanismo para diversidade genética de rotavírus é baixa em comparação aos dois mecanismos descritos anteriormente (PEDLEY et al 1984; DESSELBERGER, 1996; GHOSH; KOBAYASHI, 2011).

A recombinação homóloga é considerada rara em rotavírus devido ao seu genoma de RNAdf segmentado e os seus mecanismos de transcrição e replicação de polimerase. Entretanto, evidências deste fenômeno tem sido descritas por alguns estudos (PHAN et

al. 2007; MARTÍNEZ-LASO et al. 2009; ESONA et al. 2017; JING et al. 2018). Um estudo recente amplo que avaliou 23.627 sequências genômicas completas de rotavírus, encontrou 109 ocorrências de recombinação homóloga das quais ao menos onze prevaleceram em vários isolados sequenciados. Ao contrário do entendimento predominante, os resultados sugerem que a recombinação pode ser um elemento significativo na evolução do rotavírus e pode influenciar na diversidade de cepas circulantes (HOXIE; DENNEHY, 2020).

2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO

A prevenção e o controle da gastroenterite por qualquer etiologia envolvem a adoção de medidas gerais como consumo de água tratada, saneamento básico e descarte adequado de dejetos humanos, lavagem de mãos com água e sabão, aleitamento materno e o tratamento apropriado da criança acometida (CDC, 2015).

Além disso, considerando que as melhorias na higiene e condições sanitárias não são suficientes para reduzir significativamente os casos de rotavírus, a vacinação contra esse vírus constitui a principal estratégia de prevenção da doença, sobretudo as formas graves, que ocorrem principalmente em crianças de até dois anos de idade.

O tratamento da diarreia causada por rotavírus é essencial e consiste na pronta reposição de fluidos e eletrólitos utilizando fórmula de reidratação oral preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (60-75 mmol/L de sódio) seja comercial ou preparada em casa utilizando água, açúcar e sal. Estas fórmulas são primordiais para o manejo de crianças sem desidratação, mas com episódios intensos e repetidos de vômitos e/ou diarreia e para crianças com desidratação leve a moderada (DUGGAN et al. 2004; CHURGAY; AFTAB, 2012). Fluidos intravenosos podem ser usados em casos de desidratação grave, hiperemese, falha da terapia de reidratação oral ou grave desequilíbrio eletrolítico (CRAWFORD et al. 2017). Não existe uma terapia antiviral para a infecção por rotavírus e a maioria dos estudos ainda está em fase pré-clínica. A nitazoxanida, medicamento utilizado no tratamento de helmintíases e protozoários, tem sido avaliada como possível agente terapêutico em crianças com diarreia aguda por rotavírus, em que

se observou redução no tempo de diarreia e hospitalização (ROSSIGNOL et al. 2006; MAHAPATRO et al. 2017).

Desde 2006, duas vacinas de vírus atenuado (RV1 e RV5), administradas pela via oral, foram licenciadas em mais de 100 países e pré-qualificadas pela OMS (BURNETT; PARASHAR; TATE, 2018). A RV1 (GlaxoSmithKline, Rotarix[®], Rixensart, Bélgica), é uma vacina monovalente humana contendo a cepa RIX4414 de G1P[8] desenvolvida após passagens em cultivo celular de uma cepa selvagem de rotavírus (89-12) isolada de uma criança com gastroenterite por rotavírus (RUIZ-PALACIOS et al. 2006). No Brasil, a RV1 foi introduzida no PNI em março de 2006. É administrada em duas doses, a primeira a partir de 1 mês e 15 dias até 3 meses e 15 dias, e a segunda dose a partir de 3 meses e 15 dias até 7 meses e 29 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A RV5 (Merck and Co, RotaTeq[®], Westpoint, Pennsylvania) é constituída por cinco cepas humana-bovina reestruturadas (designadas G1, G2, G3, G4 e P1A[8]), cada uma expressando diferentes proteínas VP4 e VP7 no esqueleto da cepa bovina atenuada de rotavírus (WC3). Ela é administrada em três doses, aos 2, 4 e 6 meses, sendo a primeira entre 6-12 semanas e as subsequentes a intervalos de 4-10 semanas, completando-se o esquema até o máximo de 32 semanas (VESIKARI et al. 2006). O Quadro 3 mostra as vacinas de rotavírus licenciadas no mundo até o momento.

Um recente estudo de revisão sobre o impacto global da vacinação para rotavírus nas hospitalizações por diarreia e morte de crianças menores de cinco anos de idade no período de 2006-2019 concluiu que nesse grupo etário houve uma redução média de 59% nas hospitalizações por rotavírus, 36% nas hospitalizações por gastroenterite aguda (GEA) e 36% na mortalidade por GEA. As reduções foram maiores em países com baixa mortalidade infantil, entre grupos etários menores e em países com alta cobertura vacinal (BURNETT; PARASHAR; TATE, 2020). De fato, ensaios clínicos realizados em países da África e da Ásia com altas taxas de mortalidade infantil mostraram que as vacinas RV1 e RV5 são menos eficazes nestes locais, atingindo percentuais entre 50 e 64% (ARMAH et al. 2010; MADHI et al. 2010; ZAMAN et al. 2010). Revisões sistemáticas subsequentes demonstraram eficácias variáveis de acordo com a região com 90,6% em países desenvolvidos, comparado com 88,4% no Leste e Sudeste Asiático, 79,6% na

América Latina e no Caribe, 50% no Sul da Ásia e 46,1% na África Subsaariana (LAMBERTI et al. 2016).

As razões exatas que explicam essa diferença de eficácia são desconhecidas. No entanto, alguns fatores podem contribuir para reduzir a eficácia dessas vacinas, tais como coinfeção com outros vírus entéricos ou helmintos no momento da vacinação, uso concomitante da vacina para poliomielite, presença de anticorpos maternos transplacentários, microbioma intestinal alterado, diferenças na expressão de antígenos de grupo sanguíneo (HBGA) nestas populações, levando a uma menor resposta às vacinas, entre outros (APPAIAHGARI et al. 2014; NORDGREN et al. 2014; KAMBHAMPATI et al. 2016; TANIUCHI et al. 2016; HARRIS et al. 2017).

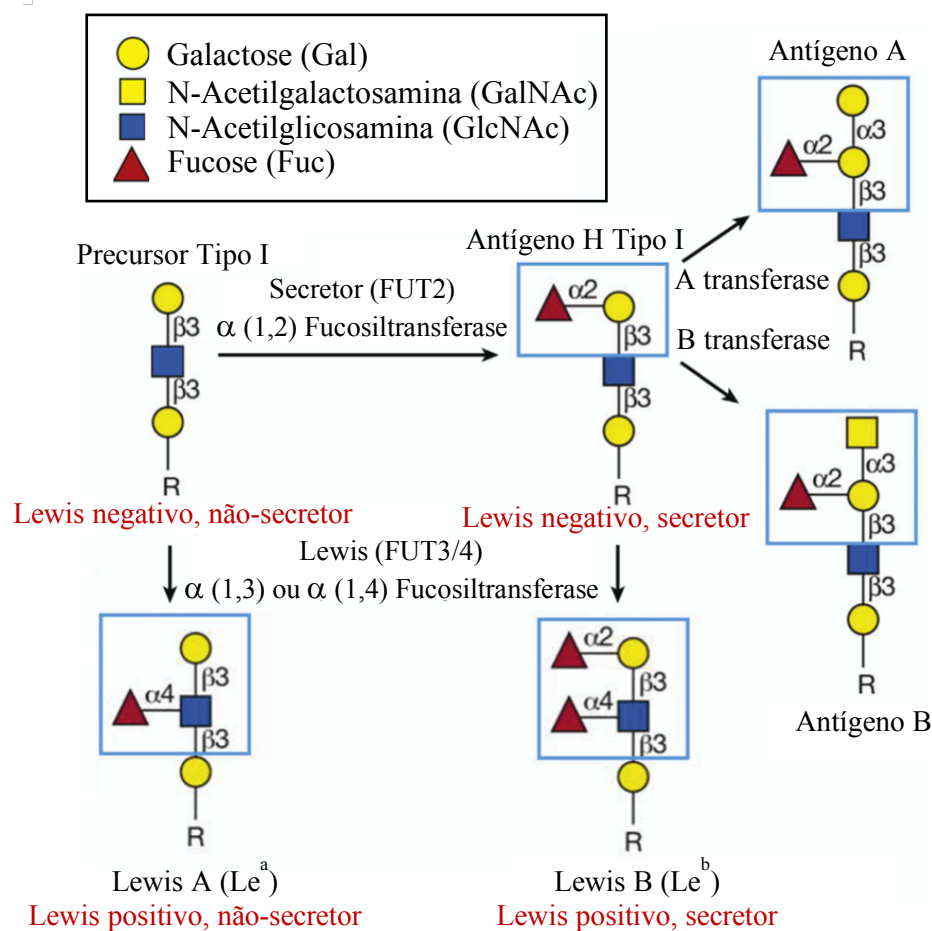
No Brasil, um estudo recente avaliou o impacto de 12 anos (2006-2018) do programa de vacinação para rotavírus na hospitalização e mortalidade por diarreia aguda. Observou-se redução de 52,5% da taxa de hospitalizações por diarreia, de 68,4% para 32,5% hospitalizações por 10.000 crianças menores de cinco anos de idade entre 2006 e 2018, com decréscimo significativo na mortalidade por diarreia (-9,8%). A região Nordeste apresentou as maiores reduções (-13,9%) (DE JESUS et al. 2020).

Nome/tipo	Fabricante	Composição	Genótipo	Doses	Formulação/estocagem	Licenciamento
Globalmente licenciadas						
Rotarix (RV1)	Glaxo Smith Kline (Bélgica)	Monovalente, cepa humana viva atenuada	G1P[8]	2	Líquida 2 - 8°C por 36 meses	> 100 países, pré- qualificada pela OMS
RotaTeq (RV5)	Merck (EUA)	Pentavalente, cepa reestruturada humana-bovina viva atenuada	G1, G2, G3, G4 e P1[8]	3	Líquida 2 - 8°C por 24 meses	> 100 países, pré- qualificada pela OMS
Rotasiil	“Serum Institute of India”, Índia e EUA	Pentavalente, cepa reestruturada humana-bovina viva atenuada	G1, G2, G3, G4 e G9	3	Liofilizada < 25°C por 30 meses <40°C por 18 meses	Índia, pré-qualificada pela OMS
ROTAVAC	Bharat Biotech, Índia	Monovalente, cepa humana neonatal viva atenuada	G9P[11]	3	Líquido congelado -20°C a longo prazo / 2-8 8°C por 7 meses	Índia e Palestina, pré- qualificada pela OMS
Nacionalmente licenciadas						
Lanzhou Lamb Rotavirus (LLR)	“Lanzhou Institute of Biological Products”, China	Monovalente, cepa de carneiro viva atenuada	G10P[12]	5	-	China
Rotavin-M1	POLYVAC, Vietnam	Monovalente, cepa humana viva atenuada	G1P[8]	2	-	Vietnam

Quadro 3. Características das vacinas de rotavírus de vírus vivo, orais, atualmente licenciadas (Fonte: Adaptado de Burnett; Parashar; Tate, 2018; Burke et al. 2019).

2.8 RELAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO COM SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS E NOROVÍRUS

Os HBGAs humanos são carboidratos complexos expressos em membranas plasmáticas de células epiteliais dos tratos digestório, genitourinário e respiratório e na forma solúvel em fluidos biológicos como saliva (TAN; JIANG, 2014). Eles são sintetizados a partir de moléculas de dissacarídeos precursoras através da adição consecutiva de monossacarídeos. A adição de cada monossacarídeo é catalisada por famílias de glicosiltransferases específicas. Quatro principais glicosiltransferases, a α -1,2 fucosiltransferase (FUT-2), a α -1,3 ou α -1,4 fucosiltransferase (FUT-3) assim como as enzimas A e B transferases (genes ABH) determinam os fenótipos de HBGA Secretor/Não secretor (com/sem antígeno H), Lewis (Lewis a, b, x e/ou y) e ABO (A, B e/ou antígeno H), respectivamente (Figura 5) (LE PENDU; RUVOËN-CLOUET et al. 2020; JIANG; LIU; TAN, 2017).



Fonte: Adaptado de RAMANI et al. (2016).

Figura 5. Esquema das vias de biossíntese dos antígenos de grupo sanguíneo do tipo 1 humanos (HBGA). A biossíntese do antígeno H do tipo I envolve a adição de um resíduo de fucose (Fuc) na posição α -1,2 do resíduo terminal de galactose (Gal) do precursor tipo I pela enzima α -1,2-fucosiltransferase (FUT-2). A modificação do antígeno H pelas enzimas A- ou B-glicosiltransferases levam a geração dos antígenos A ou B, respectivamente. O antígeno Le^a é sintetizado pela adição de um resíduo de Fuc nas posições α -1,3 ou α -1,4 da cadeia terminal de N-Acetilglicosamina (GlcNAc) do precursor tipo I pela enzima α -1,3/1,4 fucosiltransferase (FUT-3). A adição de um resíduo de Fuc nas posições α -1,3 ou α -1,4 do antígeno H tipo I pela enzima FUT-3 leva a geração de Le^b. Indivíduos que possuem a enzima FUT-2 não funcional não podem expressar fucose na posição α -1,2 e são referidos como não secretores.

A susceptibilidade genética à infecção por norovírus mediada pelos polimorfismos de HBGA é um fenômeno conhecido há décadas e apesar das evidências científicas sólidas a respeito da associação entre a infecção por norovírus, particularmente pelo genótipo GII.4, e o status secretor, o papel exato dos antígenos Lewis como mediadores de susceptibilidade resta ser melhor esclarecido (THORVEN et al. 2005; CURRIER et al. 2015; NORDGREN; SVENSSON, 2019).

Somente há menos de uma década o mesmo fenômeno foi sugerido para rotavírus (HU et al. 2012; HUANG et al. 2012). Os rotavírus se ligam a receptores celulares mediados por VP4 por meio de seu domínio VP8* de ligação a glicanos, presentes como resíduos terminais (sensíveis a sialidase) ou internos (resistentes a sialidases) de ácido siálico (FUKUDOME et al. 1989; MÉNDEZ et al. 1993). A interação específica entre rotavírus e HBGAs tem sido demonstrada por estudos de ligação “in vitro” da proteína VP8* recombinante com os antígenos A, B, H (secretor) e Lewis de diferentes fontes, incluindo saliva humana, leite, oligossacarídeos sintéticos e hemácias (HU et al. 2012; HUANG et al. 2012). O estudo da ligação a glicoconjugados não sialilados como HBGA trouxe informações importantes da patogênese deste vírus, como infecciosidade restrita de rotavírus P[11] no período neonatal relacionada à modificação na cadeia de glicano durante o desenvolvimento da criança (RAMANI et al., 2013) e fenótipo não secretor sugerido como de resistência à infecção por rotavírus (IMBERT-MARCILLE et al. 2014; PAYNE et al. 2015).

Os estudos sobre polimorfismo gênico para *FUT-2* nas diferentes populações mundiais têm demonstrado a grande diversidade de *loci* polimórficos o que pode implicar em fenótipos não secretores e secretores e em diferentes níveis de expressão de HBGA e, visto agora como receptor viral, influenciar na consequência da infecção (KODA et al. 2001; MARIONNEAU et al. 2001; SHIRATO, 2011). Indivíduos que expressam o antígeno H e que desse modo possuem a enzima *FUT-2* ativa (secretores) representam a maioria (~ 80%) da população Europeia e da América do Norte e este fato explica as razões da predominância de certos genótipos P de rotavírus (por exemplo o P[8]) que reconhecem os antígenos H. Por outro lado, o fenótipo Lewis positivo controlado pela enzima *FUT-3*, presente em aproximadamente 90% da população em geral, apresenta taxas muito menores em algumas populações latino-americanas e africanas (~ 32%), resultando em altas taxas de fenótipo Le^{a-b-} (Lewis negativo) nestas regiões (BUCARDO et al. 2009; NORDGREN et al. 2013; CORVELO et al. 2013). Este dado pode explicar a alta prevalência de rotavírus P[6] (que não reconhece o antígeno Lewis) na África comparada ao resto do mundo (LE PENDU; NYSTRÖM; RUVOËN-CLOUET, 2014; KAMBHAMPATI et al. 2016; JIANG; LIU; TAN, 2017).

Alguns estudos têm demonstrado que a interação de VP8* com os HBGA é específica para o genótipo P de modo que tem sido observado ligação de P[4] e P[8] a Le^b e antígenos H tipo 1 (fenótipo secretor Lewis positivo), enquanto que P[6] se liga somente aos antígenos H tipo 1 (HUANG et al. 2012) e ainda, tem sugerido que indivíduos não secretores e Lewis negativos são resistentes à infecção por rotavírus P[8] (IMBERT-MARCILLE et al. 2013; NORDGREN et al. 2014; ZHANG et al. 2016; GUO et al. 2020).

A associação entre a infecção por rotavírus, status secretor e o fenótipo Lewis tem sido demonstrada por estudos epidemiológicos realizados em diferentes países. A maioria desses estudos está relacionada à susceptibilidade genética à infecção pelo genótipo P[8] de rotavírus e têm demonstrado que crianças com o fenótipo secretor de HBGA são mais susceptíveis à infecção por rotavírus deste genótipo (IMBERT-MARCILLE et al. 2013; TRANG et al. 2014; PAYNE et al. 2015). Recentemente, estudos epidemiológicos realizados com crianças na Ásia (Taiwan e China) e na Europa (Espanha) demonstraram que o fenótipo secretor também é um fator genético independente associado ao risco de infecção por rotavírus. Além disso, esses estudos mostraram que o fenótipo Lewis

positivo estava associado a um risco aumentado de infecção por rotavírus (ZHANG et al. 2016; YANG et al. 2017; PÉREZ-ORTÍN et al. 2019).

De forma geral, esses dados indicam que os não-secretadores estão protegidos da infecção por rotavírus. Entretanto, é possível que haja diferenças relacionadas a populações específicas pois resultados contraditórios foram observados na Tunísia, onde a infecção por P[8] foi detectada em ambos secretadores e não secretadores (AYOUNI et al. 2015), e mais recentemente em Bangladesh, onde crianças não secretoras não foram protegidas da diarreia causada pelo genótipo P[8] (LEE et al. 2018).

A influência que o perfil de HBGA possui na eficácia das duas principais vacinas (RV1 e RV5) disponíveis para rotavírus tem sido objeto de estudos recentes. Como as vacinas RV1 e RV5 são constituídas de vírus atenuado e contém o genótipo P[8] existe a hipótese de que os fenótipos de HBGA possam afetar a replicação das vacinas no intestino, similar ao que é observado na infecção natural pelo mesmo genótipo.

Essa hipótese foi testada por meio da medição da soroconversão de imunoglobulina A (IgA) e/ou excreção da cepa vacinal em relação aos HBGAs (BUCARDO et al. 2018; BUCARDO et al. 2019; KAZI et al. 2017; ARMAH et al. 2019; POLLOCK et al. 2019). Todos os estudos observaram uma menor proporção de soroconversão em não-secretadores comparado aos secretadores.

Com exceção de um estudo na Nicarágua, onde crianças com o fenótipo Lewis A apresentaram menor soroconversão após administração de RV1 e RV5 (BUCARDO et al. 2018), nenhum estudo mostrou efeito forte dos fenótipos Lewis na resposta vacinal. Estudos avaliando a influência dos HBGAs na excreção da cepa vacinal demonstraram que indivíduos secretadores apresentaram uma proporção maior de excreção vacinal em comparação aos não secretadores, indicando que o perfil de HBGA pode influenciar na susceptibilidade vacinal e conseqüentemente na eficácia das vacinas (BUCARDO et al. 2019; POLLOCK et al. 2019; CANTELLI et al. 2020a).

Por fim, a maior parte das evidências acumuladas até o momento apontam que o fenótipo secretor está associado a uma maior resposta vacinal para RV1, medida pela

oroconverso de IgA e/ou excreção da cepa vacinal. Entretanto, estudos ainda são necessários para avaliar se a diminuição da resposta vacinal mediada pelos HBGAs se traduz em mais falhas vacinais.

3 JUSTIFICATIVA

Os rotavírus e norovírus constituem os principais agentes de diarreia aguda no mundo, causando doença especialmente na população pediátrica. O rotavírus é o principal responsável pelos casos de hospitalização e morte por diarreia entre crianças menores de cinco anos no mundo e a melhor forma de prevenir a infecção consiste na utilização de vacinas. Desde 2006, duas vacinas de uso oral (RV1 e RV5) tem reduzido drasticamente o número de casos graves e mortes associadas ao rotavírus no mundo (BURNETT; PARASHAR; TATE, 2018). No entanto, o uso em massa da vacina monovalente G1P[8] pode exercer pressão imunológica e favorecer a seleção de combinações específicas de genótipos G e P e influenciar a diversidade de cepas circulantes (SILVA et al. 2017; ROCZO-FARKAS et al. 2018; GUTIERREZ et al. 2020). Esse cenário epidemiológico desafiador de vacinação em massa e constante flutuação temporal de genótipos de rotavírus demanda uma vigilância contínua da circulação do rotavírus na população infantil com o intuito de avaliar os impactos da vacinação em massa e monitorar a emergência de novos genótipos.

As vacinas RV1 e RV5 apresentam eficácia variável conforme a localização geográfica da população. Estudos recentes têm relacionado essa variação à variabilidade de expressão dos HBGAs nas populações, os quais conferem susceptibilidade diferencial ao rotavírus e também às cepas vacinais dependendo do antígeno expresso (RAMANI et al. 2016; KAZI et al. 2017). Similar ao observado para os norovírus, os estudos realizados até o momento têm demonstrado uma associação entre fenótipos secretores de HBGA e doença por rotavírus (PAYNE et al. 2015; YANG et al. 2017). No entanto, pode haver divergências neste padrão relacionadas ao polimorfismo de HBGA em populações específicas. No Brasil, cuja população é etnicamente ampla e, portanto, com possibilidade de variações na expressão de HBGA, a associação entre os fenótipos de HBGA e a infecção por rotavírus necessita ser melhor estudada. O estudo de caracterização dos fenótipos de HBGA em crianças com diarreia aguda poderá servir de base para estudos futuros no Brasil de avaliação da eficácia vacinal baseada no HBGA.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os genótipos de rotavírus em crianças com gastroenterite aguda e avaliar a associação dos fenótipos de antígenos de grupo sanguíneo (HBGA) com a susceptibilidade à infecção por rotavírus e norovírus.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar se a infecção por rotavírus está sendo causada por genótipos G e P não incluídos na cepa vacinal e/ou emergentes;
2. Analisar se os genes VP4 e VP7 de rotavírus estudados se associam filogeneticamente a cepas isoladas no Brasil e no mundo;
3. Investigar se os genes VP4 e VP7 de rotavírus apresentam eventos de reestruturação com cepas vacinais, cepas protótipos ou com estirpes de origem diferentes.
4. Avaliar quais fenótipos de HBGA estão associados à infecção por rotavírus e norovírus;
5. Avaliar os polimorfismos em *FUT3* que ocorrem nas crianças com fenótipo Lewis negativo de HBGA;

5 DADOS COMPLEMENTARES

Para um melhor entendimento, os resultados referentes aos quartos e quinto objetivos específicos estão descritos no manuscrito publicado intitulado “*FUT2*, secretor status and *FUT3* polymorphisms of children with acute diarrhea infected with rotavirus and norovirus in Brazil” (Anexo 3). Parte dos dados sobre genótipos de norovírus inseridos no artigo citado acima e dados epidemiológicos foram publicados no artigo intitulado “Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in Southeastern Brazil in 2016” (Anexo 4).

Serão apresentados a seguir resultados do estudo que ainda não foram publicados e que fazem parte de manuscrito em elaboração, contemplando o primeiro, segundo e terceiro objetivos específicos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

5.1.1 Obtenção das amostras e aspectos éticos do estudo

Foram obtidas 307 amostras de fezes por eliminação espontânea de crianças de ambos os sexos, com até 11 anos de idade, com sinais e sintomas clínicos de gastroenterite aguda. A coleta foi realizada nos períodos de outubro de 2014 a julho de 2016 e setembro de 2017 a setembro de 2018. As amostras foram obtidas de crianças atendidas principalmente no pronto socorro e enfermarias do Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora Glória (HINSG) e no Pronto Atendimento de São Pedro (PASP) (N = 273) (Tabela 1). Nesses locais, as amostras foram coletadas diariamente, no período da manhã e da tarde, pelos estudantes de doutorado que desenvolveram a pesquisa, Débora Maria Pires Gonçalves Barreira e Marco André Loureiro Tonini e estagiários do estudo. Um pequeno número de amostras foi obtido de forma esporádica do Pronto Atendimento da Praia do Suá (PAPS), Pronto Socorro do Vitória Apart Hospital e do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). Também foram utilizadas amostras de fezes encaminhadas por serviços de saúde ao Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN – ES) para investigação de gastroenterite, obtidas no período de outubro de 2014 a maio de 2015. Dois “swabs” de mucosa bucal (gengiva e bochecha) foram obtidos de 272 das 307 crianças das quais obtivemos as amostras fecais (Tabela 1). Os “swabs” coletados foram inseridos em criotubos contendo 0,5 mL de TE

1X (Tris 0,1M/EDTA 0,01M- pH 7,0) e transportados ao Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa da Universidade Federal do Espírito Santo (LabViG - UFES) sob refrigeração. As amostras fecais foram coletadas em frasco de coleta universal e transportadas sob refrigeração ao LabViG-UFES para então serem conservadas em congelador à -20°C até o momento da preparação da suspensão fecal.

Tabela 1. Distribuição do número de amostras fecais e “swabs” bucais obtidos de crianças com diarreia por local de coleta.

Locais de coleta	Fezes N (%)	“Swabs” bucais N (%)
HINSG	153 (49,8)	149 (54,7)
PASP	120 (39,1)	115 (42,3)
PAPS	07 (2,3)	03 (1,1)
HUCAM	04 (1,3)	04 (1,5)
LACEN	21 (6,9)	0 (0)
Vitória Apart Hospital	02 (0,6)	01 (0,4)
Total	307	272

Foi aplicado questionário ao responsável pela criança para obtenção de informações referentes aos pacientes como idade, sexo, local de residência, sinais e sintomas clínicos e vacinação prévia para rotavírus (número de doses, tipo de vacina e lote) (Anexo 2). Este projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, em 06 de novembro de 2015, parecer número 1.312.166 (Anexo 1). Os espécimes clínicos foram coletados após obtenção de consentimento livre e esclarecido por parte do responsável e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE não foi utilizado em relação às amostras obtidas via LACEN-ES, por fazerem parte de uma estratégia de vigilância em doença diarreica aguda.

5.1.2 Distribuição de amostras de fezes e casos de rotavírus de acordo com a idade das crianças infectadas, local e ano de coleta

A distribuição dos casos positivos para rotavírus conforme a idade das crianças pode ser observada na Tabela 2. A idade das crianças infectadas com rotavírus variou de 1 mês a 10 anos, média de 33 meses. A distribuição de casos positivos em relação aos locais de coleta e número de amostras coletadas pode ser observada na Tabela 3. Somente no HINSG e no PASP foram detectadas crianças infectadas por rotavírus (Tabela 3). O número de amostras fecais coletadas durante os anos de estudo com o respectivo número de amostras positivas para rotavírus pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 2. Frequência de crianças infectadas por rotavírus de acordo com a idade.

Idade	Total amostras (%)	Rotavírus N (%)
Até 12m	105 (34,2)	9 (8,5)
>12m-2a	97 (31,6)	9 (9,2)
>2a-5a	67 (21,8)	13 (19,4)
>5a	38 (12,4)	5 (13,1)
Total	307	36

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

Local de coleta	Total amostras N (%)	Rotavírus N (%)
HINSG	153 (49,8)	14 (9,1)
PASP	120 (39)	22 (18,3)
Outros*	34 (11)	0
TOTAL	307	36 (11,7)

* Estão incluídas as amostras do HUCAM, LACEN-ES, PAPS e Vitória Apart Hospital.

Tabela 4. Total de amostras coletadas por ano e número de casos positivos de rotavírus.

Ano	Total amostras N (%)	Rotavírus N (%)
------------	---------------------------------	----------------------------

2014	12 (4)	5 (41,6)
2015	68 (22,1)	2 (2,9)
2016	122 (39,7)	21 (17,2)
2017	22 (7,2)	2 (9,1)
2018	83 (27)	6 (7,2)
TOTAL	307	36 (11,7)

5.1.3 Principais sinais e sintomas clínicos

Tabela 5. Informações clínicas de crianças infectadas por rotavírus em comparação ao grupo controle negativo

Informações clínicas	Rotavírus+ N (%)	Rotavírus/Norovírus- N (%)
Diarreia	35 (97,2)	184 (100)
Vômito	29 (80,5)	110 (59,7)
Febre	23 (65,7)*	133 (72,2)
Sintomas respiratórios	22 (61,1)	106 (57,6)
Dor abdominal	24 (66,6)	102 (55,4)
Total	36	184

* Informação sobre apresentação de febre não obtida para um paciente. Legenda: Rotavírus+, crianças infectadas por rotavírus; Rotavírus/Norovírus-, crianças negativas para rotavírus e norovírus.

5.2 GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS

O gene VP7 das amostras positivas para rotavírus detectadas por ensaio imunoenzimático ou qPCR foram amplificadas para posterior caracterização do genótipo G. Os iniciadores e as condições de amplificação utilizados na amplificação do gene VP7 foram descritos por Gouvea e outros (1990) (Quadro 4). A PCR foi realizada no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Quadro 4. Iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes VP7 de rotavírus.

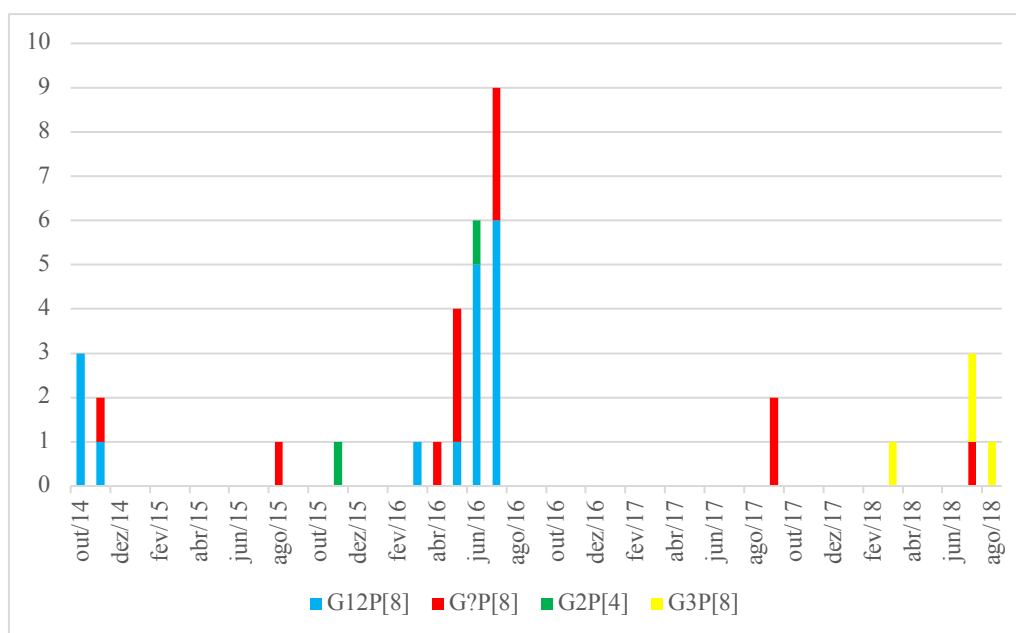
Gene	Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
VP7	Beg9 (<i>Forward</i>)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1062	Gouvea et al. (1990)
	End9 (<i>Reverse</i>)	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG		

A combinação de genótipos G e P de rotavírus encontrados nas crianças com diarreia e a distribuição em relação ao local de coleta podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Frequência dos genótipos G e P de rotavírus detectados nas crianças com diarreia de acordo com os locais de coleta.

Genótipo	Local de coleta		
	N (%)		
	HINSG	PASP	Total
G12P[8]	6 (46,1)	11 (50)	17 (48,6)
G?P[8]	3 (23,1)	9 (41)	12 (34,3)
G2P[4]	2 (15,4)	0 (0)	2 (5,7)
G3P[8]	2 (15,4)	2 (9)	4 (11,4)
Total	13 (37)	22 (63)	35 (100)

5.2.1 Distribuição dos genótipos de rotavírus de acordo com o mês de coleta



* Não houve coleta de amostras no período de agosto de 2016 a agosto de 2017.

Gráfico 1. Distribuição dos genótipos de rotavírus de acordo com o mês de coleta.

5.2.2 Sequenciamento e análise filogenética de VP4 e VP7

Os *amplicons* de 876 pb (VP4) e 1062 pb (VP7) pb obtidos na PCR foram purificados utilizando a enzima ExoProStar™ (GE Healthcare). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o kit Big-Dye Terminator v1.3 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) em sequenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer utilizando os iniciadores “forward” (4con3 para VP4 e Beg9 para VP7) utilizado nas reações de amplificação. A condições da reação de sequenciamento estão descritas no Quadro 5. A purificação dos produtos de reação do sequenciamento foi realizada por precipitação com etanol PA e EDTA (125mM, pH 8,0).

Quadro 5. Programa de amplificação utilizado na PCR para sequenciamento.

Temperatura °C	Tempo	Nº de ciclos
96	1 min	1
95	10 seg	35
50	5 seg	
60	4 min	
72	10 min	1
4	≤ 24 h	1

As seqüências de nucleotídeos de VP4 e VP7 obtidas no estudo foram inicialmente submetidas ao “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) para verificação de similaridade com outras seqüências disponíveis no banco de dados do *GenBank* e definição dos genótipos G e P de rotavírus. Posteriormente, as seqüências foram editadas utilizando o programa “Sequence Scanner” v2.0 (Applied Biosystems) e alinhadas utilizando o programa “SeaView” v.4.7 (GOUY et al. 2010). As seqüências correspondentes aos genótipos G e P foram analisadas separadamente e comparadas entre si e com seqüências referências de cada genótipo, assim como comparadas com as seqüências referências das cepas vacinais RV1 e RV5 (Tabelas 7-11). As árvores filogenéticas para as seqüências de VP4 e VP7 foram construídas utilizando o programa

MEGA versão 10.1.8 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) pelo método neighbor-joining, com a distância genética calculada pelo modelo Kimura parâmetro utilizando 2000 pseudo-réplicas (Figuras 6 e 7).

Foram sequenciadas com sucesso os genes VP7 e VP4 de 21 (58,3%) e 33 (91,6%) amostras, respectivamente. A maioria das amostras não sequenciadas para “G” apresentaram baixa carga viral (Ct médio de 32), embora com as mesmas amostras pudemos tipar o “P”. A análise filogenética das sequências de VP7 mostrou que as quatro estirpes sequenciadas pertencentes ao genótipo G3 foram caracterizadas como o genótipo emergente G3P[8] “equine-like”. Nossas sequências foram geneticamente relacionadas (99,2% a 100% de identidade de nt) à sequências G3P[8] “equine-like” previamente detectadas no Brasil (MH569778, MT386426) e em outros países como Eslováquia (MN203567), Espanha (KU550297), Japão (LC477366) e Taiwan (MF044092) (Figura 6 e Tabela 8).

A análise filogenética das sequências de VP7 tipadas como G12 demonstrou que todas as estirpes pertencentes ao genótipo G12 que circularam entre 2014 e 2016 em nosso estudo se agruparam dentro da linhagem GIII (G12-III) e indicou que estas estirpes são geneticamente relacionadas a cepas que circularam nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil em 2014 (KP732442, KP732448 e KP732449) e em outros países como Espanha (MH171399), Estados Unidos (MF469406), França (KU291324) e Itália (KU048656), com identidade de nucleotídeos variando de 99,4% a 100% (Figura 6 e Tabela 7).

A análise filogenética das sequências de VP4 demonstrou que todas as estirpes de P[8] detectadas no estudo, tanto as que abrigaram o genótipo G12 quanto o genótipo G3, se agruparam na linhagem 3. Essas estirpes são geneticamente relacionadas (96,7% a 100% de identidade de nt) a estirpes que circularam no Brasil (KY198355, MN366047, MT386441) e em outros países como Espanha (MH171367), Estados Unidos (MF469382), Itália (KU048603), Japão (LC477395) e Moçambique (KP222873) (Figura 7 e Tabela 10).

Tabela 7. Percentual de identidade de nucleotídeos entre algumas sequências de VP7 genótipo rotavírus G12 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências de G12 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.

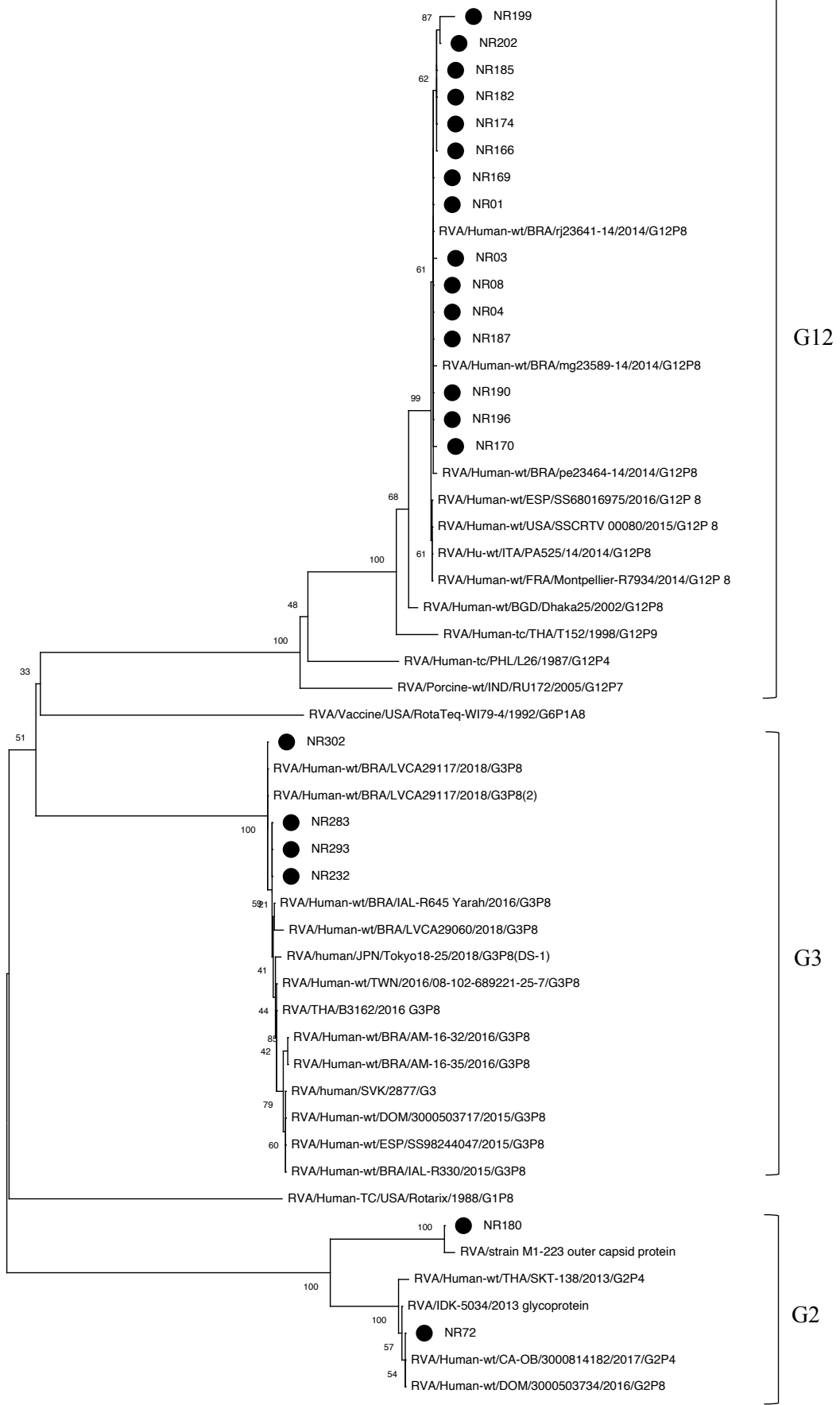
Sequências RVA G12	Identidade de nucleotídeos																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
NR01	1	ID	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR04	2	100,0%	ID	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR08	3	100,0%	100,0%	ID	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR169	4	100,0%	100,0%	100,0%	ID	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR170	5	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	ID	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	99,6%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	70,9%	72,2%
NR174	6	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	ID	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	70,9%	72,2%
NR182	7	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	100,0%	ID	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	70,9%	72,2%
NR185	8	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	100,0%	100,0%	ID	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	70,9%	72,2%
NR190	9	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	ID	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR196	10	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	ID	99,6%	99,8%	99,8%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
NR202	11	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,4%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	ID	99,4%	99,4%	99,6%	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%	70,7%	72,0%
RVA/Human-wt/BRA/pe23464-14/2014/G12P8	12	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	ID	99,6%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	71,1%	72,4%
RVA/Human-wt/BRA/mg23589-14/2014/G12P8	13	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	ID	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	70,9%	72,2%
RVA/Human-wt/BRA/tj23641-14/2014/G12P8	14	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	100,0%	100,0%	99,6%	99,8%	99,8%	ID	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	71,1%	72,4%
RVA/Human-wt/ESP/SS68016975/2016/G12P[8]	15	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	99,6%	99,8%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	71,1%	72,4%
RVA/Human-wt/USA/SSCRTV_00080/2015/G12P[8]	16	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	99,6%	99,8%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	71,1%	72,4%
RVA/Hu-wt/ITA/PA525/14/2014/G12P8	17	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	99,6%	99,8%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	71,1%	72,4%
RVA/Human-wt/FRA/Montpellier-R7934/2014/G12P[8]	18	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,8%	99,8%	99,4%	99,6%	99,6%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	71,1%	72,4%
RVA/Human-TC/USA/Rotarix/1988/G1P8	19	71,1%	71,1%	71,1%	71,1%	70,9%	70,9%	70,9%	70,9%	71,1%	71,1%	70,7%	71,1%	70,9%	71,1%	71,1%	71,1%	71,1%	71,1%	ID	73,8%
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A8	20	72,4%	72,4%	72,4%	72,4%	72,2%	72,2%	72,2%	72,2%	72,4%	72,4%	72,0%	72,4%	72,2%	72,4%	72,4%	72,4%	72,4%	72,4%	73,8%	ID

Tabela 8. Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP7 genótipo rotavírus G3 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências G3 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.

Sequências de RVA G3	Identidade de nucleotídeos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NR232	1	ID	100,0%	100,0%	99,8%	99,8%	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%	99,8%	77,7%	76,8%
NR283	2	100,0%	ID	100,0%	99,8%	99,8%	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%	99,8%	77,7%	76,8%
NR293	3	100,0%	100,0%	ID	99,8%	99,8%	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%	99,8%	77,7%	76,8%
NR302	4	99,8%	99,8%	99,8%	ID	99,6%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,6%	77,9%	77,0%
RVA/Human-wt/BRA/IAL-R645_Yarah/2016/G3P8	5	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	ID	99,6%	99,2%	99,2%	99,6%	99,6%	77,5%	76,6%
RVA/Human-wt/BRA/LVCA29060/2018/G3P8	6	99,4%	99,4%	99,4%	99,2%	99,6%	ID	98,8%	98,8%	99,2%	99,2%	77,4%	76,4%
RVA/human/SVK/2877/G3	7	99,4%	99,4%	99,4%	99,2%	99,2%	98,8%	ID	100,0%	99,2%	99,6%	77,4%	76,8%
RVA/Human-wt/ESP/SS98244047/2015/G3P8	8	99,4%	99,4%	99,4%	99,2%	99,2%	98,8%	100,0%	ID	99,2%	99,6%	77,4%	76,8%
RVA/human/JPN/Tokyo18-25/2018/G3P8(DS-1)	9	99,4%	99,4%	99,4%	99,2%	99,6%	99,2%	99,2%	99,2%	ID	99,6%	77,5%	77,0%
RVA/Human-wt/TWN/2016/08-102-689221-25-7/G3P8	10	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,6%	99,2%	99,6%	99,6%	99,6%	ID	77,5%	77,0%
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A8	11	77,7%	77,7%	77,7%	77,9%	77,5%	77,4%	77,4%	77,4%	77,5%	77,5%	ID	73,8%
RVA/Human-TC/USA/Rotarix/1988/G1P8	12	76,8%	76,8%	76,8%	77,0%	76,6%	76,4%	76,8%	76,8%	77,0%	77,0%	73,8%	ID

Tabela 9. Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP7 genótipo rotavírus G2 do estudo (NR) (em realce cinza) em comparação às sequências de VP7 de RV1 e RV5 e sequências G2 de estirpes coletadas no Brasil e em diferentes países.

Sequências RVA G2	Identidade de nucleotídeos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
NR72	1	ID	90,1%	100,0%	99,8%	100,0%	99,2%	90,3%	71,2%	71,1%
NR180	2	90,1%	ID	90,1%	90,3%	90,1%	90,5%	99,4%	71,1%	71,6%
RVA/Human-wt/CA-OB/3000814182/2017/G2P[4]	3	100,0%	90,1%	ID	99,8%	100,0%	99,2%	90,3%	71,2%	71,1%
RVA IDK-5034/2013 glycoprotein	4	99,8%	90,3%	99,8%	ID	99,8%	99,0%	90,5%	71,4%	71,1%
RVA/Human-wt/DOM/3000503734/2016/G2P[8]	5	100,0%	90,1%	100,0%	99,8%	ID	99,2%	90,3%	71,2%	71,1%
RVA/Human-wt/THA/SKT-138/2013/G2P[4]	6	99,2%	90,5%	99,2%	99,0%	99,2%	ID	90,7%	71,1%	70,9%
RVA strain M1-223 outer capsid protein	7	90,3%	99,4%	90,3%	90,5%	90,3%	90,7%	ID	70,7%	72,0%
RVA/Human-TC/USA/Rotarix/1988/G1P8	8	71,2%	71,1%	71,2%	71,4%	71,2%	71,1%	70,7%	ID	73,8%
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]	9	71,1%	71,6%	71,1%	71,1%	71,1%	70,9%	72,0%	73,8%	ID



0.050

Figura 6. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de nucleotídeos de VP7 de cepas de rotavírus, Região Metropolitana de Vitória, ES. Cepas do estudo estão indicadas por um círculo preto. As cepas de referência foram obtidas da base de dados do Genbank. Valores de “bootstrap” (2000 replicas).

Tabela 11. Percentual de identidade de nucleotídeos entre as sequências de VP4 genótipo rotavírus P[4] do estudo (em realce cinza) em comparação às sequências de VP4 de RV1 e RV5 e sequências de P[4] de estirpes coletadas no Brasil e no mundo.

Sequências VP4 P4	Identidade de nucleotídeos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
RVA/BRA/2015/G2P4/ES_LVGI072	1 ID	96,8%	99,1%	99,1%	97,2%	97,2%	85,5%	84,4%
RVA/BRA/2016/G2P4/ES_LVGI180	2 96,8%	ID	96,7%	97,0%	99,6%	99,6%	85,5%	84,1%
RVA/Human-wt/DOM/3000503730/2016/G2P[4]	3 99,1%	96,7%	ID	98,9%	97,0%	97,0%	85,8%	84,8%
RVA/Human-wt/ETH/BD526/2016/G2P[4]	4 99,1%	97,0%	98,9%	ID	97,4%	97,4%	85,8%	84,8%
RVA/13-103/CHN/2013/GxP[4]	5 97,2%	99,6%	97,0%	97,4%	ID	100,0%	85,5%	84,1%
RVA/Human-wt/HUN/ERN5523/2012/G3P4	6 97,2%	99,6%	97,0%	97,4%	100,0%	ID	85,5%	84,1%
RVA/Human-TC/USA/Rotarix/1988/G1P8	7 85,5%	85,5%	85,8%	85,8%	85,5%	85,5%	ID	90,5%
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]	8 84,4%	84,1%	84,8%	84,8%	84,1%	84,1%	90,5%	ID

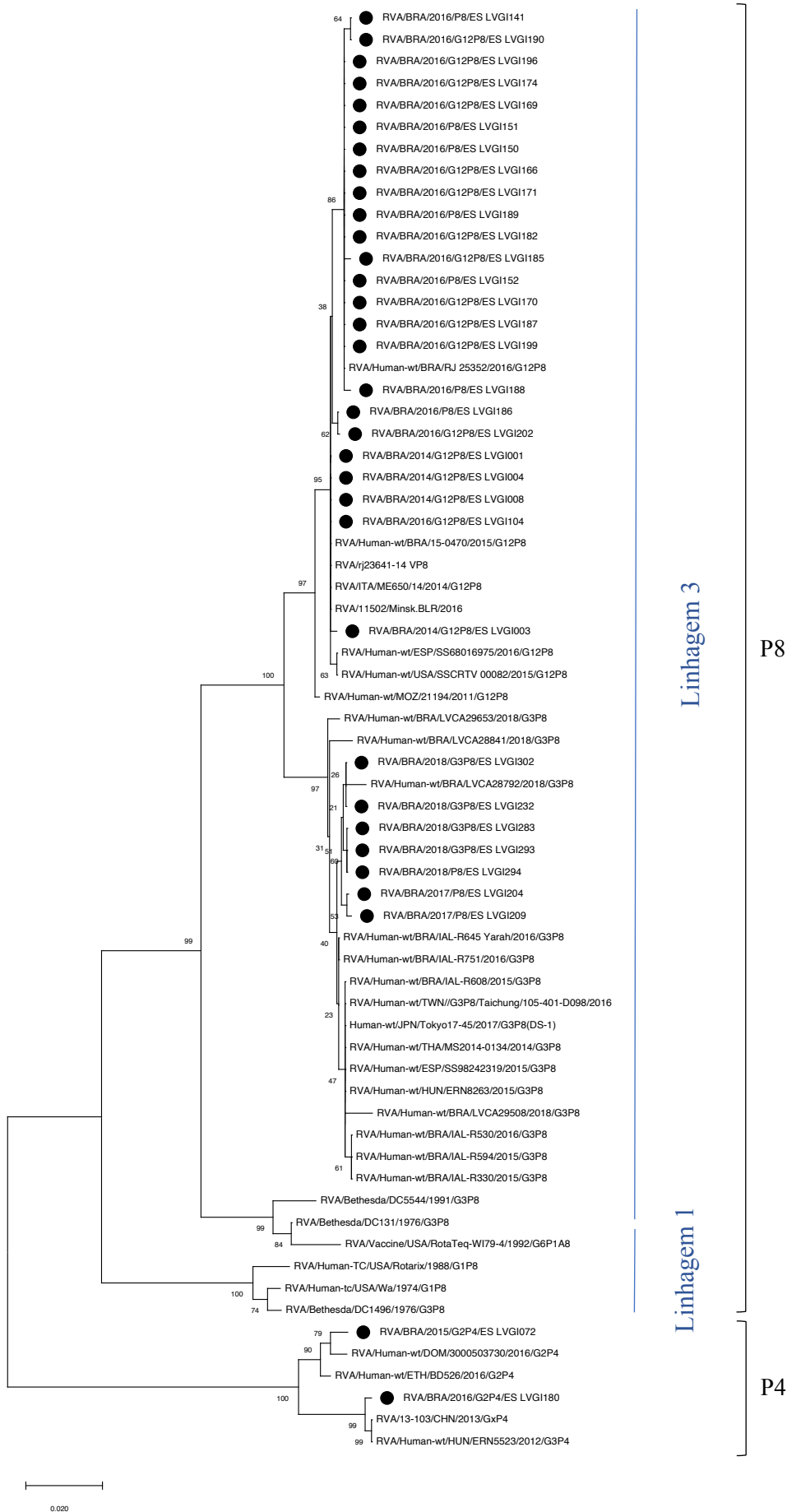


Figura 7. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de nucleotídeos de VP4 de cepas de rotavírus, Região Metropolitana de Vitoria, ES. Cepas do estudo (P[8] e P[4])

estão indicadas por um círculo preenchido de preto. Valores de “bootstrap” (2000 replicas).

5.3 SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE P[8] e P[4] DE ROTAVÍRUS LIGADORAS DE GLICANOS

As estirpes do genótipo P[8] (todas da linhagem 3) e as duas do genótipo P[4] detectados no nosso estudo não apresentaram variações nas seqüências de aminoácidos de VP8* ligadores de glicanos, tanto nos resíduos conservados como nos não conservados quando comparadas à outras estirpes P[8] e às cepas vacinais de RV1 e RV5 (Figura 8).

Genótipo	157	167	177	187	197	207	216	
RV1	NEFYNRRTLT	SDTRLVGIFK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	STANLNNISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
RV5	NEFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNDISI	IIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
HALL166	GAYSQYSTLS	TSNKLCAMWK	REGRVVYVAG	ETPNASESY	LTINNDNSNV	SCDAEFLYIIP	RSQTELCTQY	INNGLPPI
SA11	GSIGQYGSLL	SSPKLYAVMK	HNEKLYTYEG	QTPNARTGHY	STTNYSVNM	TAFCDFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
DS1	GDFSNRRTLT	SSNRLVGMK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	NTADLNNISI	IIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
WA	NEFYNRRTLT	SDTRFVGILK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	STANLNNISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P6	AEFQHKRRTLT	SDTKLAGEFK	FYNSVWTFYG	ETPHATDYS	STSNLSEVET	VIHVEFYIIP	RSQESKNEY	INTGLPPM
P[8]Rota134	NDFYNRRTLT	SDIRLVGILK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	NTANLDGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]Rota162	NDFYNRRTLT	SDTRLVGILK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	NTANLDGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]Rota183	NDFYNRRTLT	SDTRLVGILK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	NTANLDGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]Rota287	NDFYNRRTLT	SDTKLVGIXK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
VP8 Tunisian	SEFYNRRTLT	SDTRLVGILK	YGGRIWTFHK	ETPGAIDSS	NTSDLTISISI	IIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNYGLPPI
P[8]NR01	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR03	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR04	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR07	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR08	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INXGLPPX
P[8]NR104	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR141	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNXLPPI
P[8]NR150	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR151	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR152	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR166	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR169	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR170	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR171	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR174	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR182	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR185	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR186	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR187	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR188	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR189	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR190	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR196	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR199	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR202	TDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTANLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR204	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR209	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR232	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR283	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR293	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[8]NR302	SDFYNRRTLT	SDTKLVGILK	YGGRIWTFHG	ETPRATDSS	NTTNLNGISI	TIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPPI
P[4]NR72	SDFSNRRLT	SSNRLVGMK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	NTADLNNISI	IIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLP--
P[4]NR180	SDFSNRRTLT	SSNRLVGMK	YGGRVWTFHG	ETPRATDSS	STADLNNISI	IIHSEFYIIP	RSQESKNEY	INNGLPXI

Figura 8. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de VP8* de rotavírus de estirpes do estudo em comparação às seqüências de VP8* das cepas vacinais RV1 e RV5 e de outras estirpes isoladas no mundo. As estirpes do estudo podem ser identificadas com o genótipo P seguido de “NR...”. Os aminoácidos ligadores de glicanos que são conservados e não conservados são identificados por sombreado cinza e azul, respectivamente. Aminoácidos variantes estão marcados em vermelho.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo descrevemos a importância dos rotavírus, que apesar do uso das vacinas, foram responsáveis, juntamente com os norovírus, por 101 (32,9%) casos de diarreia aguda na população pediátrica. G12P[8] foi o genótipo de rotavírus mais frequentemente detectado e no ano de 2018 detectamos o genótipo emergente G3P[8] “equine-like”. Além disso, nossos resultados reforçam o conhecimento atual de que indivíduos com o fenótipo secretor de HBGA são mais susceptíveis à infecção por rotavírus e norovírus do que os não secretores.

A infecção por rotavírus é a principal causa de diarreia aguda grave em crianças menores de cinco anos de idade. Apesar da introdução global da vacinação para o rotavírus por mais de uma década, estas infecções ainda resultam em mais de 100.000 mortes anualmente, principalmente em países em desenvolvimento (GBD, 2018). Em nosso estudo, os rotavírus foram detectados em 11,7% das amostras de fezes de crianças com diarreia aguda. Os rotavírus foram detectados ao longo de todo período de coleta (2014-2018) com o maior número de amostras positivas no ano de 2016 (N = 21), ano em que o esforço amostral também foi maior com 122 amostras coletadas. A frequência de positividade observada é similar aos 12% encontrados por Sá e outros (2015) em estudo com crianças hospitalizadas no Nordeste do Brasil, mas inferior aos 33% encontrado por Silva e outros (2017) em estudo com pacientes hospitalizados e ambulatoriais do Nordeste, Sudeste e Sul do país (SILVA et al. 2017). Recentemente, um estudo conduzido em 11 estados de três das cinco regiões do Brasil observou uma frequência de 10,5% e 13,7% de rotavírus em amostras de 2018 e 2019, respectivamente. Entretanto, uma maior prevalência de rotavírus foi observada na região Nordeste (18,7%) comparado às regiões Sudeste (3,4%) e Sul (12,5%) (GUTIERREZ et al. 2020).

Contrastando com a frequência que observamos no presente estudo nas crianças atendidas no Pronto Socorro do Hospital Infantil, detectamos uma taxa de 33,9% de rotavírus em amostras obtidas entre fevereiro de 2003 e junho de 2004, com crianças com diarreia aguda atendidas na mesma instituição, porém, período anterior à implementação da vacinação em nosso país (SPANNO et al. 2008). A menor ocorrência de rotavírus no presente estudo em comparação ao estudo anterior é um reflexo da introdução da vacina

RV1 na população do ES a partir de 2006. Além disso, se considerarmos que as crianças que afluem ao Pronto Socorro do Hospital Infantil são as que apresentam quadro clínico de maior gravidade em relação às de atendimento ambulatorial, observamos que esses dados mostram a eficácia da vacina em prevenir casos graves de rotavírus que levam à hospitalização.

A diarreia por rotavírus foi mais frequente em crianças acima de 12 meses, com destaque para o grupo etário maior que 2 a 5 anos, representando a maior proporção dos casos dentre os 36 positivos para rotavírus. Essa mudança de padrão de ocorrência da infecção por rotavírus envolvendo crianças mais velhas tem sido observada sobretudo em países que introduziram a vacinação em massa para rotavírus conforme observado em estudos no Brasil e nos Estados Unidos (NEVES et al. 2016; SILVA et al. 2017; CARVALHO-COSTA et al. 2019; GUTIERREZ et al. 2020; HULL et al. 2011). Especula-se que essa mudança de perfil se deve à presença de uma coorte de indivíduos susceptíveis composta por crianças mais velhas que não foram expostas à infecção natural pelo rotavírus no passado e à redução da eficácia da vacina com o avançar da idade, relacionada à queda nos níveis de anticorpos neutralizantes (LINHARES; JUSTINO, 2014; LUCHS; TIMENETSKY, 2016).

O predomínio de positividade do genótipo G12P[8] entre as amostras coletadas entre 2014 e 2016 reflete o momento epidemiológico desse período em que se observava emergência e predominância desse genótipo no Brasil e em diferentes partes do mundo (DELOGU et al. 2015; ATEGBO et al. 2015; LUCHS et al. 2016; SILVA et al. 2017; MOURE et al. 2018). O genótipo G2P[4], embora detectado em menor proporção (5,4%), tem sido um dos mais prevalentes no Brasil nos anos que sucederam a introdução da vacina RV1, representando 62% dos genótipos detectados entre 2007-2015 (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; SANTOS et al. 2017). Apesar do predomínio de G2P[4] estar relacionado a flutuações temporais, a proteção vacinal inferior contra esse genótipo (39% na América Latina e 58% na Europa) do que contra cepas homotípicas e parcialmente heterotípicas (> 80% de proteção) levantou a hipótese de que o uso da vacina RV1 poderia ter favorecido a seleção desse genótipo (LESHEM et al. 2014; SANTOS et al. 2016).

O genótipo emergente G3P[8] “equine-like” “DS-1-like” foi o único a ser detectado dentre as amostras coletadas em 2018. Esse genótipo, resultante de um evento de reestruturação raro entre uma estirpe humana e uma estirpe equina, foi inicialmente detectado em crianças com gastroenterite aguda na Austrália em 2013 (KIRKWOOD et al. 2014). A partir desse ano, o genótipo G3P[8] “equine-like” se disseminou e se tornou endêmico mundialmente (PERKINS et al. 2017; KOMOTO et al. 2018; SADIQ et al. 2019; ROVIDA et al. 2020). No Brasil, esse genótipo foi inicialmente detectado na região Amazônica em estudo conduzido em 2016 (GUERRA et al. 2016). Entretanto, em uma investigação genética retrospectiva com amostras fecais coletadas entre 2013 e 2017, Luchs e outros (2019), detectaram o genótipo G3P[8] “equine-like” no estado do Paraná, Foz do Iguaçu, em amostras de 2015, sugerindo que esse genótipo entrou no Brasil pela região Sul. Posteriormente, essa nova variante se disseminou rapidamente para outros estados do Brasil, sendo o genótipo mais prevalente em 2017 (GUTIERREZ et al. 2020).

A emergência global da cepa G3P[8] “equine-like” “DS-1-like”, sobretudo em países que utilizam a vacina RV1, levanta preocupações a respeito da eficácia vacinal e do potencial das vacinas em induzir pressão seletiva em cepas zoonóticas. Desse modo, torna-se evidente a necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua para avaliar o possível impacto desse genótipo nos programas de vacinação em massa para rotavírus no mundo.

Há décadas descritos como receptores para os norovírus, somente na última década os HBGAs foram reconhecidos como fatores de ligação para o rotavírus (HU et al. 2012; HUANG et al. 2012). Essa descoberta tem permitido um melhor entendimento sobre a infecção e a susceptibilidade do hospedeiro ao vírus e ainda contribuído para explicar a diferença de eficácia das vacinas para rotavírus entre países (ARMAH et al. 2019; BUCARDO et al. 2019; PÉREZ-ORTÍN et al. 2019; CANTELLI et al. 2020a). Em nosso estudo, demonstramos a associação entre o status secretor de HBGA e a infecção de crianças por rotavírus e norovírus, achados consistentes com investigações epidemiológicas prévias conduzidas no mundo (CURRIER et al. 2015; IMBERT-MARCILLE et al. 2014; TRANG et al. 2014; PAYNE et al. 2015; PÉREZ-ORTÍN et al. 2019; MACDONALD et al. 2020). Nossos resultados corroboram os dados existentes na literatura e contribuem para o entendimento dessa associação em uma população altamente miscigenada como a Brasileira.

Devido a circulação de cepas emergentes P[8]-4 com padrões distintos de ligação a glicanos resultando em maior propensão à infecção em não-secretoras (ZELLER et al. 2015; KHACHOU et al. 2020), avaliamos possíveis mutações nas sequências de aminoácidos ligadoras de glicanos de VP8* da estirpe de P[8] que infectou o paciente não-secretor do estudo. A análise da VP8* P[8] do paciente, assim como de outras estirpes de P[8] (todas estirpes P[8]-3 clássicas) detectadas no estudo, não demonstrou variações nos resíduos ligadores de HBGA, comparadas à outras estirpes de P[8] clássicas detectadas no mundo. Desse modo, variações no VP8* não puderam explicar a infecção do paciente. Uma hipótese é que essa criança foi fracamente imunizada, em parte possivelmente pelo seu status de HBGA (não-secretor), e também por ter recebido somente uma dose da vacina RV1. Esse paciente pode ter posteriormente ingerido uma alta dose do vírus e ter adoecido. Esse fenômeno pode exercer impacto entre países ou regiões no que diz respeito à qualidade do saneamento, higiene e à cobertura vacinal.

Além dos estudos sobre susceptibilidade à infecção natural por rotavírus, alguns estudos têm investigado o papel dos HBGAs na resposta à vacina de rotavírus. Nesse sentido, alguns argumentam que a eficácia diferencial das duas principais vacinas contra rotavírus (RV1 e RV5) entre países de baixa e alta renda pode estar ligada à expressão diferente de HBGA na população. De fato, maior imunogenicidade tem sido observada em crianças com o fenótipo secretor comparado aos não-secretoras (ARMAH et al. 2019; KAZI et al. 2017; BUCARDO et al. 2018).

Em nosso estudo, a maioria das crianças (72%) foram vacinadas contra o rotavírus, particularmente com a RV1, e isso pode ser considerado como uma introdução de um viés uma vez que se espera que os não-secretoras sejam menos responsivos à vacina que os secretoras. Entretanto, as crianças infectadas por rotavírus ainda foram, em sua maioria, secretoras, indicando que não ocorreu esse viés, ou o status secretor pode não ter sido um fator importante na determinação da eficácia da vacina, ou que o fator mais importante é a suscetibilidade genética no momento da infecção. Além disso, outros fatores além dos HBGAs podem ter contribuído para a falha vacinal como o estado nutricional, coinfeção com outros patógenos entéricos, transferência passiva de anticorpos maternos anti-rotavírus, entre outros (DESSELBERG, 2017).

O genótipo de norovírus predominante globalmente, GII.4, detectado na maioria das nossas amostras (76%), infectou somente crianças com o fenótipo secretor. Esses resultados confirmam ainda mais a especificidade do genótipo GII.4 em infectar os secretores, previamente observada por meio de estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes países, como Burkina Faso, China, Equador, EUA, Nicarágua e Vietnã (CURRIER et al. 2015; TRANG et al. 2014; NORDGREN et al. 2013; LIU et al. 2014; LOPMAN et al. 2015; BUCARDO et al. 2009). Além disso, entre as amostras de GII.4, todas pertenceram à variante GII.4 Sydney, que já foi demonstrada ser secretora-específica (CURRIER et al. 2015). Embora ainda não sejam claras, as razões para o domínio global de GII.4 estão pelo menos parcialmente ligadas às suas características de ligação à HBGA. As cepas GII.4 ligam-se aos glicanos de todos os indivíduos secretores positivos, independentemente de seus fenótipos ABO e Lewis. Além disso, como sugerido anteriormente, uma afinidade aumentada de HBGA para algumas das variantes GII.4 mais recentes pode ter contribuído para o domínio epidemiológico dessas variantes (DE ROUGEMONT et al. 2011). É concebível que essas características, além da alta prevalência de indivíduos secretores na população mundial, forneçam um amplo espectro de hospedeiros suscetíveis em todo o mundo e afetem a infecção por GII.4.

Nós observamos uma tendência a favor da ocorrência da infecção por rotavírus em crianças secretoras com o fenótipo Lewis positivo (91,4%), sem atingir significância estatística, provavelmente devido ao pequeno número de casos de rotavírus. Este resultado é similar ao obtido em um estudo epidemiológico conduzido em Burkina Faso e na Nicarágua que mostrou que nenhuma criança não-secretora/Lewis negativa com diarreia foi infectada por rotavírus genótipo P[8] (NORDGREN et al. 2014). Além disso, estudos prévios sugerem que ambos o Lewis b e os antígenos secretores são necessários para ligação à VP8* de P[8] e P[4] (ZHANG et al. 2016; MA et al. 2015; BARBÉ et al. 2018). Por outro lado, estudos estruturais recentes envolvendo ligação de VP8* P[8] aos HBGA apresentaram resultados conflitantes. Enquanto alguns indicam que a fucose adicional conferida pelo antígeno Lewis b poderia causar impedimento estérico a essa interação, outros estudos demonstraram ligação de VP8* de P[8] ao antígeno Lewis b via um bolso formado por duas folhas beta (GOZALBO-ROVIRA et al. 2019; SUN et al. 2020; XU et al. 2020). Estudos adicionais são necessários para esclarecer esse assunto.

No geral, os resultados da fenotipagem de Lewis revelaram que o status de Lewis (positivo/negativo) não é um mediador de susceptibilidade para a infecção por norovírus, uma observação consistente com estudos prévios (NORDGREN et al. 2013; BUCARDO et al. 2009; LARSSON et al. 2006). Entretanto, um estudo realizado em Taiwan observou que o genótipo Lewis positivo era um fator protetor contra gastroenterite grave por norovírus (TU et al. 2017). Além disso, enquanto as três amostras de norovírus GI infectou somente crianças Lewis positivo, o genogrupo GII infectou tanto crianças Lewis negativo como Lewis positivo, similar à resultados prévios de Burkina Faso (NORDGREN et al. 2013). A favor da preferência de GI em infectar indivíduos Lewis positivo, Kubota e outros demonstraram uma base estrutural para o reconhecimento dos antígenos Lewis pelos norovírus GI (KUBOTA et al. 2012).

A frequência de 17,1% de indivíduos Lewis negativos observada no presente estudo é maior que a registrada em populações Europeias tais como da Escandinávia (5,7%), Espanha (6%) e Portugal (10%) (PÉREZ-ORTÍN et al. 2019; LARSSON et al. 2006; SERPA et al. 2003). No entanto, a frequência desse fenótipo na população altamente miscigenada como a Brasileira é similar à de outros países do continente Americano como a Colômbia (22%) e a Nicarágua (25%), e pode alcançar até 32% em algumas populações Africanas (NORDGREN et al. 2014; BUCARDO et al. 2009; TORRADO et al. 1997). Entre os indivíduos Lewis negativo, quatro principais polimorfismos de um nucleotídeo (SNP – “Single Nucleotide Polymorphisms”) foram identificados nas posições T59G, G508A, T202C e C314T. Esses resultados estão de acordo com um estudo conduzido com a população Amazônica e um recente estudo de coorte realizado no Rio de Janeiro, nos quais estas SNPs foram detectadas com frequências semelhantes (CANTELLI et al. 2020b; CORVELO et al. 2013). Além disso, a ocorrência da combinação de SNPs encontrada no presente estudo também é observada em populações da Ásia, África e da Europa, com frequência maior das mutações T59G e G508A nos primeiros dois continentes e a T202C e C314T no último (NISHIHARA et al. 1994; SOEJIMA; KIMURA; KODA, 2004; SOEJIMA et al. 2009).

Nosso estudo demonstrou a importância dos rotavírus como causadores de diarreia aguda em crianças. O predomínio dos genótipos emergentes G12P[8] e G3P[8] “equine-like”

entre as amostras do estudo reforça a importância e a necessidade de monitoramento contínuo dos genótipos G e P de rotavírus e sequenciamento desses genes com a finalidade de detectar genótipos incomuns e eventos de reestruturação, respectivamente, e ainda avaliar o impacto desses fenômenos na eficácia das vacinas na população. Além disso, nossos resultados corroboram os dados da literatura demonstrados em diferentes países de que os indivíduos com o status secretor de HBGA são mais susceptíveis à infecção por rotavírus e norovírus. Entretanto, a recente descoberta de estirpes emergentes de P[8]-4 que apresenta mutações na região de VP8* ligadora de HBGA, permitindo infecção em não-secretadores, necessita de mais investigações. Existe o potencial dessa variante competir com a estirpe clássica P[8]-3 e ampliar a fração de infectados, sobretudo em populações com alta frequência de não-secretadores.

7 CONCLUSÕES

- Os rotavírus representaram uma causa importante de diarreia aguda na população pediátrica estudada;
- Genótipos emergentes de rotavírus no Brasil e no mundo foram detectados em nossa área geográfica como G12P[8] e G3P[8] “equine-like”;
- As crianças com o status secretor de *FUT2* são de fato mais susceptíveis às infecções por rotavírus e norovírus, comparadas às não-secretoras, e contribuem para melhorar o entendimento da susceptibilidade do hospedeiro a esses vírus e sua epidemiologia na América Latina;
- A alta taxa de Lewis negativo e a combinação de SNPs, além do status secretor, podem refletir a população altamente mista do Brasil e, em certa medida, restringir a infecção por rotavírus, mas não por norovírus.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.R.; KRAFT, L.M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v. 141, p. 359-360, 1963.

AHMED, S.M. et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 725-730, 2014.

ALMEIDA, T.N.V. et al. Phylogenetic analysis of G1P[8] and G12P[8] rotavirus A samples obtained in the pre- and post-vaccine periods, and molecular modeling of VP4 and VP7 proteins. **Acta Tropica**, v. 173, p. 153-159, 2017.

ANSARI, A.S.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 448, 1991.

APPAIAHGARI, M.B. et al. Transplacental rotavirus IgG interferes with immune response to live oral rotavirus vaccine ORV-116E in Indian infants. **Vaccine**, v. 32, n. 6, p. 651-656, 2014.

ARANA, A. et al. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 137-144, 2016.

ARIAS, C.F. et al. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 890–893, 2015.

ARMAH, G.E. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 606-614, 2010.

ARMAH, G.E. et al. Rotavirus Vaccine Take in Infants Is Associated With Secretor Status. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 5, p. 746-749, 2019.

ATEGBO, S. et al. Emergence of G12 rotavirus diarrhea in childhood in Libreville. **Archives de Pediatrie**, v. 22, n. 3, p. 323-324, 2015.

AYOUNI, S. et al. Rotavirus P[8] Infections in Persons with Secretor and Nonsecretor Phenotypes, Tunisia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 2055-2058, 2015.

BALL, J.M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101-104, 1996.

BÁNYAI, K. et al. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 916-919, 2007.

BÁNYAI, K. et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber ' s bats , Serbia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 19–26, 2017.

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

BARBÉ, L. et al. Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

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

BERNSTEIN, D.I. Rotavirus overview. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 3 (suplemento), p. 50-53, 2009.

BISHOP, R.F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p. 1281-1283, 1973.

BISHOP, R.F. Natural history of human rotavirus infection. **Archives of Virology Supplement**, v.12, p. 119-128, 1996.

BISHOP, RF. Discovery of rotavirus: Implications for Child health. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, p. 81–85, 2009.

BUCARDO, F. et al. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 4, p. 728-735, 2009.

BUCARDO, F. et al. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1282-1294, 2012.

BUCARDO, F.; NORDGREN, J. Impact of vaccination on the molecular epidemiology and evolution of group A rotaviruses in Latin America and factors affecting vaccine efficacy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 34, p. 106-113, 2015.

BUCARDO, F. et al. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

BUCARDO, F. et al. Histo-blood group antigens and rotavirus vaccine shedding in Nicaraguan infants. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

BURKE, R.M. et al. Current and new rotavirus vaccines. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, 2019.

BURNETT, E.; PARASHAR, U.; TATE J. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions. **Paediatric Drugs**, 2018.

BURNETT, E.; PARASHAR, U.; TATE J. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006-19: a literature review and meta-analysis. **Lancet Global Health**, v. 8, n. 9, p. 1195-1202, 2020.

BUTZ, A.M. et al. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. **Pediatrics**, v. 92, p. 202-205, 1993.

CAILLÈRE, N. et al. A major outbreak of gastroenteritis in Réunion Island in 2012: first identification of G12 rotavirus on the Island. **Euro Surveill**, v. 18, n. 19, 2013.

CANTELLI, C.P. et al. Rotavirus A shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2018. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020a.

CANTELLI, C.P. et al. Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 82, 2020b.

CARMO, G.M. et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 4, 2011.

CARVALHO-COSTA, FA et al. The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. **BMC Pediatrics**, v. 19, n. 1, 2019.

CASTELLO, A.A. et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2046-2050, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Global Diarrhea Burden. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html>>. Acesso em: 2 de Nov. 2020.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Photos of Rotavirus, 1978. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/rotavirus/about/photos.html>>. Acesso em: 20 de Fev. 2018.

CHIVERS et al. Postlicensure experience & with rotavirus vaccination in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. **Expert Review of Vaccines**, v.17, n. 11, p. 1037-1051, 2018.

CHURGAY, C.A.; AFTAB, Z. Gastroenteritis in children: Part II. Prevention and management. **American Family Physician Journal**, v. 85, n. 11, p. 1066-1070, 2012.

COOK, N. et al. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 289-302, 2004.

CORTESE, M.M. et al. Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccine. **Pediatrics**, v. 132, n. 1, p. 25-33, 2013.

CORVELO, T.C. et al. The Lewis histo-blood group system: molecular analysis of the 59T>G, 508G>A, and 1067T>A polymorphisms in an Amazonian population. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

CRAWFORD, S.E. et al. Rotavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 3, 2017.

CUNLIFFE, N.A. et al. Serotype g12 rotaviruses, Lilongwe, Malawi. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 87-90, 2009.

CURRIER, R.L. et al. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 11, p. 1631-1638, 2015.

DE JESUS, M.C.S. et al. Impact of a twelve-year rotavirus vaccine program on acute diarrhea mortality and hospitalization in Brazil: 2006-2018. **Expert Review of Vaccines**, v. 19, n. 6, p. 585-593, 2020.

DE ROUGEMONT, A. et al. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, p. 4057-4070, 2011.

DELOGU, R. et al. Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 8, p. 1292-1302, 2015.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 46, p. 69-95, 1996.

Desselberger U. Differences of Rotavirus Vaccine Effectiveness by Country: Likely Causes and Contributing Factors. **Pathogens**, v. 6, n. 4, 2017.

DUGGAN, C. et al. Scientific rationale for a change in the composition of oral rehydration solution. **JAMA**, v. 291, n. 21, p. 2628-2031, 2004.

DUNN, S.J. et al. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. **Archives Virology**, v. 140, n. 11, p. 1969-1978, 1995.

ENWERONU-LARYEA, C.C. et al. Rotavirus genotypes associated with childhood severe acute diarrhoea in southern Ghana: a cross-sectional study. **Virology Journal**, v. 10, n. 287, 2013.

ESONA, M.D. et al. Characterization of a triple-recombinant, reassortant rotavirus strain from the Dominican Republic. **The Journal of General Virology**, v. 98, n. 2, p. 134-142, 2017.

FLEWETT TH; BRYDEN AS; DAVIES H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v.2, n. 7844, 1973.

FUKUDOME, K.; YOSHIE, O.; KONNO, T. Comparison of human, simian and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. **Virology**, v. 172, p. 196-205, 1989.

GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Infectious Diseases**. v. 18, n.11, p. 1211-1228, 2018.

GENTSCH, J.R. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GENTSCH, J.R. et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, suplemento 1, p. 146-159, 2005.

GHOSH S; KOBAYASHI N. Whole genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. **Future Microbiology**, v. 6, p. 1049–1065, 2011.

GIRI, S. et al. Molecular epidemiology of rotaviruses in the south-east Asian region from 2009 to 2015. **Vaccine**. 2018.

GÓMEZ, M.M. et al. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 385-388, 2014.

GOUVEA, V. et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GOUY, M.; GUINDON S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.

GOZALBO-ROVIRA, R. et al. Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, 2019.

GUERRA, S.F.S. et al. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. **The Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3131-3138, 2016.

GUO, L.A. et al. Epidemiology and HBGA-susceptibility investigation of a G9P[8] rotavirus outbreak in a school in Lechang, China. **Archives of Virology**, v. 165, n. 6, p. 1311-1320, 2020.

GRAHN, A. et al. Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. **Human mutation**, v. 18, n. 4, p. 358-359, 2001.

GREENBERG, H.B.; ESTES, M.K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939–51, 2009.

GÜNAYDIN, G. et al. Association of elevated rotavirus-specific antibody titers with HBGA secretor status in Swedish individuals: The FUT2 gene as a putative susceptibility determinant for infection. **Virus Research**, v. 211, p. 64-68, 2016.

GURWITH, M. et al. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 144, n. 3, p. 218-224, 1981.

GUTIERREZ, M.B. et al. Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018-2019. **Pathogens**, v. 9, n. 7, 2020.

HAGBOM, M. et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, 2011.

HARRIS, V. et al. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. **Gut Microbes**, p. 1-9, 2017.

HEMMING, M.; VESIKARI, T. Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTeq® vaccine. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p. 51-58, 2013.

HOXIE, I; DENNEHY, J.J. Intragenic recombination influences rotavirus diversity and evolution. **Virus Evolution**, v. 6. n. 1. 2020.

HU, L. et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 256-259, 2012.

HUANG, P. et al. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. **Journal of Virology**, v. 86, n. 9, p. 4833-4843, 2012.

HULL, J.J. et al. National Rotavirus Strain Surveillance System. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 30, 2011.

ICTV. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em 29 Out. 2020.

IMBERT-MARCILLE, B.M. et al. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus a of the P[8] genotype. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1227–1230, 2014.

International Vaccine Access Center (IVAC). Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Disponível em <<http://www.view-hub.org/viz/>>. Acesso em 12 Fev. 2020.

ITURRIZA-GOMARA, M. et al. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, n. 1-2, p. 93-103, 1999.

JAPHET, M.O. et al. Group A rotaviruses circulating prior to a national immunization programme in Nigeria: Clinical manifestations, high G12P[8] frequency, intra-genotypic divergence of VP4 and VP7. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 2, p. 239-249, 2018.

JIANG, X.; LIU, Y.; TAN, M. Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus, new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 4, 2017.

JING, Z. et al. A G3P[13] porcine group A rotavirus emerging in China is a reassortant and a natural recombinant in the VP4 gene. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 317-328, 2018.

JONESTELLER, C.L. et al. Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A Systematic Review of the First Decade of Global Postlicensure Data , 2006 – 2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, p. 840–850, 2017.

KAMBHAMPATI, A. et al. Host Genetic Susceptibility to Enteric Viruses: A Systematic Review and Metaanalysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 1, p. 11-18, 2016.

KARAFILLAKIS, E.; HASSOUNAH, S.; ATCHISON, C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006-2014. **Vaccine**, v. 33, p. 2097-2107, 2015.

KAZI, A.M. et al. Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 786–789, 2017.

KHACHOU, A. et al. Host-Range Shift Between Emerging P[8]-4 Rotavirus and Common P[8] and P[4] Strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 5, p. 836-839, 2020.

KIKUCHI, W. et al. Detection in Japan of an equine-like G3P[8] reassortant rotavirus A strain that is highly homologous to European strains across all genome segments. **Archives of Virology**, v. 163, n. 3, p. 791-794, 2018.

KIRKWOOD, C.D.; ROCZO-FARKAS, S.; Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2013. **Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report**, v. 38, n. 44, 2014.

KNIPE, D.M. et al. *Fields virology*. 5 ed. New York, Raven Press, v. 1, 2007.

KODA, Y. et al. Contrasting Patterns of Polymorphisms at the ABO-Secretor Gene (FUT2) and Plasma $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase Gene (FUT6) in Human Populations. **Genetics**, v. 158, p. 747-756, 2001.

KOMOTO, S. et al. Characterization of unusual DS-1-like G3P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 5, p. 890-898, 2018.

KUBOTA, T. et al. Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 20, p. 11138-11150, 2012.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LAIRD, A.R. et al. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3100-3111, 2003.

LAMBERTI, L.M. et al. A Systematic Review of the Effect of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Outcomes Among Children Younger Than 5 Years. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 9, p. 992-998, 2016.

LARSSON, M.M. et al. Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 10, p. 1422-1427, 2006.

LE PENDU, J.; NYSTRÖM, K.; RUVOËN-CLOUET, N. Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. **Current Opinion in Virology**, v. 7, n. 1, p. 88–94, 2014.

LE PENDU, J; RUVOËN-CLOUET, N. Fondness for sugars of enteric viruses confronts them with human glycans genetic diversity. **Human Genetics**, v. 139, n. 6-7, p. 903-910, 2020.

LEITE, J.P.G.; CARVALHO-COSTA, F.A. ; LINHARES, A.C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 745–753, 2008.

LEE, B. et al. Histoblood Group Antigen Phenotype Determines Susceptibility to Genotype-specific Rotavirus Infections and Impacts Measures of Rotavirus Vaccine Efficacy. **The Journal of Infectious Diseases**. 2018.

LESHEM, E. et al. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 847–856, 2014.

LEVY, K.; HUBBARD, A.E.; EISENBERG, J.N. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 1487-1496, 2009.

LINHARES, A.C.; JUSTINO, M.C. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. **Expert Reviews Vaccine**, v. 13, n. 1, p. 43-57, 2014.

LIU, P. et al. Genetic susceptibility to norovirus GII.3 and GII.4 infections in Chinese pediatric diarrheal disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 11, p. 305-309, 2014.

LOPEZ S; ARIAS CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 271–278, 2004.

LOPMAN, B.A. 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**, v. 211, n. 11, p. 1813-1821, 2015.

LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. DO C. S. T. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. **Einstein**. v. 14, n. 2, p. 278–87, 2016.

LUCHS, A. et al. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. **Acta Tropica**, v. 156, p. 87-94, 2016.

LUCHS, A. et al. Spread of the emerging equine-like G3P[8] DS-1-like genetic backbone rotavirus strain in Brazil and identification of potential genetic variants. **The Journal of General Virology**, v. 100, n. 1, p. 7-25, 2019.

LUDERT, J.E. et al. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. **J Virol**, v. 70, n. 1, p. 487-493, 1996.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p. 1145-1156, 2001.

MA, X et al. Binding Patterns of Rotavirus Genotypes P[4], P[6], and P[8] in China with Histo-Blood Group Antigens. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015.

MACDONALD, J. et al. FUT2 Secretor Status Influences Susceptibility to VP4 Strain-Specific Rotavirus Infections in South African Children. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 795, 2020.

MADHI, S.A. et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 289-298, 2010.

MAHAPATRO, S. et al. Nitazoxanide in Acute Rotavirus Diarrhea: A Randomized Control Trial from a Developing Country. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, 2017.

MALHERBE, H.H.; STRICKLAND-CHOMLEY, M. Simian virus SA11 and the related 'O' agent. **Arch. Gesamte Virusforsch**, v. 22, p. 235-245, 1967.

MARIONNEAU, S. et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, v. 83, p. 565-573, 2001.

MARIONNEAU, S. et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1967-1977, 2002.

MARIONNEAU, S. et al. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 6, p. 1071-1077, 2005.

MARTELLA, V. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 246-255, 2010.

MARTINEZ-LASO, J. et al. Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles. **Journal of General Virology**, v.90, n. 4, p. 935-943, 2009.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204-3219, 2008a.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, n. 8, p. 1621–1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. **Future Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1303-1316, 2009.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 10, p. 2431-2436, 2010.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**. v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; VAN RANST, M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p. 426–433, 2012.

MCCLAIN, B. et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, n. 2, p. 587-599, 2010.

MCDONALD, S.M. et al. Diversity and relationships of cocirculating modern human rotaviruses revealed using large-scale comparative genomics. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9148-9162, 2012.

MCDONALD, S.M. et al. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 448-460, 2016.

MEBUS, C.A. et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **Univ. Nebraska Res. Bull**, v. 233, p. 1-16, 1969.

MÉNDEZ E.; ARIAS C.F., LÓPEZ S. Binding of sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotavirus to epithelial cells in culture. **Journal of Virology**, v. 67, p. 5253-5259, 1993.

MIHALOV-KOVÁCS E et al. Candidate New Rotavirus Species in Sheltered Dogs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 4–7, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação** – Brasília, 1 ed. 2014.

MOURE, U.A.E. et al. Emergence of G12 and G9 rotavirus genotypes in the Central African Republic, January 2014 to February 2016. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, 2018.

NEVES, M.A. et al. High prevalence of G12P[8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 5, p. 782-789, 2016.

NISHIHARA, S. et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29271-29278, 1994.

NORDGREN, J. et al. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

NORDGREN, J. et al. Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 11, p. 1567–1573, 2014.

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

PARASHAR, U.D. et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.

PATEL, M.M. et al. Global seasonality of rotavirus disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 4, p. 134-147, 2013.

PATTON, J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. **Discovery Medicine**, v. 13, n. 68, p. 85-97, 2012.

PAYNE, D.C. et al. Epidemiologic Association Between FUT2 Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 11, p. 1040–1045, 2015.

PEDLEY, S. et al. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. **Journal of General Virology**, v. 65, p. 1141-1150, 1984.

PEREIRA, P. et al. Fifteen years of experience with the oral live-attenuated human rotavirus vaccine: reflections on lessons learned. **Expert Review of Vaccines**, v. 19, n. 8, p. 755-769, 2020.

PÉREZ-ORTÍN, R. et al. Histo-Blood Group Antigens in Children with Symptomatic Rotavirus Infection. **Viruses**, v. 11, n. 4, 2019.

PERKINS, C. et al. Genomic Characterization of the First Equine-Like G3P[8] Rotavirus Strain Detected in the United States. **Genome Announcements**, v. 5, n. 47, 2017.

PESAVENTO, J.B. et al. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 309, p. 189-219, 2006.

PHAN, T.G. et al. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 10188-10194, 2007.

PIETSCH, C.; LIEBERT, U.G. Human infection with G12 rotaviruses, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1512-1515, 2009.

POLLOCK, L. et al. Non-secretor histo-blood group antigen phenotype is associated with reduced risk of clinical rotavirus vaccine failure in malawian infants. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 8, p. 1313-1319, 2019.

PROCTER, J. et al. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. **Tissue antigens**, v.50, p. 475-483, 1997.

RAHMAN, M. et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2382-2390, 2007.

RAMACHANDRAN, M. et al. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. **Virology**, v. 278, n. 2, p. 436-444, 2000.

RAMANI, S. et al. The VP8* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. **Journal of Virology**, v. 87, n. 13, p. 7255-7264, 2013.

RAMANI, S. et al. Diversity in Rotavirus-Host Glycan Interactions: A "Sweet" Spectrum. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 263-273, 2016.

RAY, P. et al. First detection of G12 rotaviruses in newborns with neonatal rotavirus infection at all India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3824-3827, 2007.

RAY, P.G. et al. Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 3, p. 341-349, 2007.

ROCZO-FARKAS, S. et al. The Impact of Rotavirus Vaccines on Genotype Diversity: A Comprehensive Analysis of 2 Decades of Australian Surveillance Data. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 546-554, 2018.

ROSE, T.L. et al. Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1843-1846, 2013.

ROSSIGNOL, J.F. et al. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. **Lancet.**, v. 368, n. 9530, p. 124-129, 2006.

ROTA Council. Disponível em <<http://preventrotavirus.org/vaccine-introduction/global-introduction-status/>>. Acesso em 22. Out. 2020.

Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Disponível em <<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>>. Acesso em 29. Out. 2020.

ROVIDA, F. et al. Rotavirus molecular epidemiology in hospitalized patients, Northern Italy, 2015-2018. **The New Microbiologica**, v. 43, n.1, p. 1-5, 2020.

RUIZ-PALACIOS, G.M. et al. Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 11-22, 2006.

SÁ, A.C. et al. Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 9, p. 1480-1490, 2015.

SADIQ, A. et al. Molecular characterization of human group A rotavirus genotypes circulating in Rawalpindi, Islamabad, Pakistan during 2015-2016. **PLoS One**, v. 14, n. 7, 2019.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n. 1, p. 29-56, 2005.

SANTOS, V. S et al. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: systematic review and meta-analysis. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, n. 1, p. 83, 2016.

SANTOS, V.S.; BEREZIN, E.N.; GURGEL, R.Q. Rotavirus in Latin America: Current Situation and Perspectives. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2017.

SAXENA, K. et al. Human intestinal enteroids: a new model to study human rotavirus infection, host restriction, and pathophysiology. **Journal of Virology**, v. 90, n. 1, p. 43-56, 2015.

SEHERI, L.M. et al. Rotavirus strain diversity in Eastern and Southern African countries before and after vaccine introduction. **Vaccine**. 2017.

SERPA, J. et al. Lewis enzyme (alpha1-3/4 fucosyltransferase) polymorphisms do not explain the Lewis phenotype in the gastric mucosa of a Portuguese population. **Journal of Human Genetics**, v. 48, n. 4, p. 183-189, 2003.

SHARMA, S. et al. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take. **Viruses**, v. 12, n. 3, 2020.

SHIRATO, H. Norovirus and histo-blood group antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 64, p. 95-103, 2011.

SILVA, M.F. et al. VP8*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 200-205, 2013.

SILVA, M.F. et al. G1P[8] species A rotavirus over 27 years--pre- and post-vaccination eras--in Brazil: full genomic constellation analysis and no evidence for selection pressure by Rotarix® vaccine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 206-218, 2015.

SILVA, M.F. et al. VP7 and VP8* genetic characterization of group A rotavirus genotype G12P[8]: Emergence and spreading in the Eastern Brazilian coast in 2014. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 1, p. 64-70, 2017.

SOEJIMA, M.; KIMURA, H.; KODA, Y. Two novel FUT3 alleles responsible for Lewis-null phenotypes in Sri Lanka. **Transfusion**, v. 44, n. 10, p. 1534-1535, 2004.

SOEJIMA, M. et al. Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. **Transfusion**, v. 49, n. 5, p. 959-966, 2009.

SPANO, L.C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent Escherichia coli in Brazilian children with acute diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 359-363, 2008.

SUN, X. et al. Structural Basis of Glycan Recognition in Globally Predominant Human P[8] Rotavirus. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 156-170, 2020.

TAN, M.; JIANG, X. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 16, n. e5, p. 1–20, 2014.

TANIUCHI, M. et al. Impact of enterovirus and other enteric pathogens on oral polio and rotavirus vaccine performance in Bangladeshi infants. **Vaccine**, v. 34, n. 27, p. 3068-3075, 2016.

TATE, J.E. et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 136-141, 2012.

TATE, J.E. et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, suplemento 2, p. 96-105, 2016.

THORVEN, M. et al. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 24, 2005.

TORRADO, J. et al. Lewis, secretor, and ABO phenotypes, and sulfomucin expression in gastric intestinal metaplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 6, n. 4, p. 287-289, 1997.

TORT, L.F. et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: first detection of the emerging genotype G12. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 5, p. 754-763, 2015.

TRANG, N. et al. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in vietnamese children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1366-1374, 2014.

TROEGER, C. et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. **JAMA Pediatrics**, v.172, n.10, p. 958-965, 2018.

TU, L.T. et al. Genetic Susceptibility to Norovirus GII.4 Sydney Strain Infections in Taiwanese Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 4, p. 353-357, 2017.

VELAZQUEZ, F.R. et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 14, p. 1022-1028, 1996.

VESIKARI, T. et al. Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 23-33, 2006.

VESIKARI, T. et al. Impact and effectiveness of RotaTeq® vaccine based on 3 years of surveillance following introduction of a rotavirus immunization program in Finland. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 12, p. 1365-1373, 2013.

WANGCHUK, S. et al. Dominance of emerging G9 and G12 genotypes and polymorphism of VP7 and VP4 of rotaviruses from Bhutanese children with severe diarrhea prior to the introduction of vaccine. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

XU, S et al. Molecular basis of P[II] major human rotavirus VP8* domain recognition of histo-blood group antigens. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 3, 2020.

YANG, T.A. et al. Genetic Susceptibility to Rotavirus Gastroenteritis and Vaccine Effectiveness in Taiwanese Children. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

ZAMAN K. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 615-623, 2010.

ZELLER, M. et al. Emerging OP354-Like P[8] Rotaviruses Have Rapidly Dispersed from Asia to Other Continents. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 8, p. 2060-2071, 2015.

ZENG, S.Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

ZHANG, X.F. et al. P[8] and P[4] Rotavirus Infection Associated with Secretor Phenotypes Among Children in South China. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34591, 2016.

ANEXO 1

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Liliana Cruz Spano

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 28640414.5.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.312.166

Apresentação do Projeto:

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

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

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

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

ANEXO 2


Ficha de investigação

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



Article

FUT2, Secretor Status and FUT3 Polymorphisms of Children with Acute Diarrhea Infected with Rotavirus and Norovirus in Brazil

Marco André Loureiro Tonini ^{1,*} , Débora Maria Pires Gonçalves Barreira ¹,
Luciana Bueno de Freitas Santolin ¹, Lays Paula Bondi Volpini ¹, José Paulo Gagliardi Leite ²,
Béatrice Le Moullac-Vaidye ³, Jacques Le Pendu ³ and Liliana Cruz Spano ¹

¹ Laboratory of Virology and Infectious Gastroenteritis, Pathology Department, Health Science Center, Federal University of Espírito Santo, Maruípe, Vitória 1468, ES, Brazil; deborambarreira@yahoo.com.br (D.M.P.G.B.); freitas_lb@yahoo.com.br (L.B.d.F.S.); layspaula90@gmail.com (L.P.B.V.); liliana.spano@ufes.br (L.C.S.)

² Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro 4365, RJ, Brazil; jppgleite@ioc.fiocruz.br

³ CRCINA, Inserm, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; beatrice.vaidye@inserm.fr (B.L.M.-V.); jacques.le-pendu@univ-nantes.fr (J.L.P.)

* Correspondence: marco.tonini@ufes.br

Received: 23 July 2020; Accepted: 24 September 2020; Published: 25 September 2020



Abstract: Host susceptibility according to human histo-blood group antigens (HBGAs) is widely known for norovirus infection, but is less described for rotavirus. Due to the variable HBGA polymorphism among populations, we aimed to evaluate the association between HBGA phenotypes (ABH, Lewis and secretor status) and susceptibility to rotavirus and norovirus symptomatic infection, and the polymorphisms of *FUT2* and *FUT3*, of children from southeastern Brazil. Paired fecal-buccal specimens from 272 children with acute diarrhea were used to determine rotavirus/norovirus genotypes and HBGAs phenotypes/genotypes, respectively. Altogether, 100 (36.8%) children were infected with rotavirus and norovirus. The rotavirus P[8] genotype predominates (85.7%). Most of the noroviruses (93.8%) belonged to genogroup II (GII). GII.4 Sydney represented 76% (35/46) amongst five other genotypes. Rotavirus and noroviruses infected predominantly children with secretor status (97% and 98.5%, respectively). However, fewer rotavirus-infected children were Lewis-negative (8.6%) than the norovirus-infected ones (18.5%). *FUT3* single nucleotide polymorphisms (SNP) occurred mostly at the T59G > G508A > T202C > C314T positions. Our results reinforce the current knowledge that secretors are more susceptible to infection by both rotavirus and norovirus than non-secretors. The high rate for Lewis negative (17.1%) and the combination of SNPs, beyond the secretor status, may reflect the highly mixed population in Brazil.

Keywords: host susceptibility; histo-blood group antigens (HBGAs); norovirus; rotavirus; secretor status; polymorphisms of *FUT2* and *FUT3*; Lewis

1. Introduction

Diarrheal diseases remain a leading cause of morbidity and mortality in children under five years of age, and account for nearly 500,000 deaths annually in the world, especially in low-income countries. Enteric viruses, particularly norovirus and rotavirus, are the major etiological agents of diarrhea worldwide [1,2]. Since 2006, two oral, live-attenuated rotavirus vaccines (Rotarix[®] and RotaTeq[®]) have been implemented nationally in 98 countries, and their use has substantially reduced global child deaths from diarrheal illness [3,4]. Nevertheless, the effectiveness of current vaccines is lower in low-

and middle-income countries compared with higher-income settings [5]. Among other factors, host genetic characteristics have been proposed to explain this difference [6,7].

Rotaviruses are classified into 10 species (A to J), with species A being the major cause of infections in children [8]. Two outer capsid proteins, VP4 (protease-sensitive protein) and VP7 (glycoprotein), are traditionally used to define the rotavirus P and G genotypes, respectively. Currently, 36 G and 51 P genotypes have been identified, among which six G genotypes (G1, G2, G3, G4, G9, and G12) and three P genotypes (P[4], P[6], P[8]) are more prevalent globally [9]. As for noroviruses, they are dually classified based on the complete VP1 (major capsid protein) coding region, corresponding to open reading frame (ORF) 2, and on a partial RNA polymerase (RdRp) coding region located at the 3'-end of the ORF1. Ten norovirus genogroups (GI-GX) are recognized according to the VP1 classification, each being subdivided into genotypes. Genogroups GI and GII that encompass more than 30 genotypes are the main causes of human infection. Among them, the GII.4 genotype is responsible for the majority of norovirus outbreaks and sporadic cases worldwide [10,11]. The *RpRd* gene classifies noroviruses into eight P-groups and 62 P-types [12].

Both viruses recognize and bind to histo-blood group antigens (HBGAs) which act as host attachment factors for viral infection on enteric epithelial cells [13–15]. Human HBGAs are highly polymorphic carbohydrates expressed on mucosal epithelial cells and the surface of erythrocytes and in biological fluids such as saliva and milk. Their synthesis occurs by the sequential addition of monosaccharides to precursor disaccharides by four major glycosyltransferases: α -1, 2-fucosyltransferase (FUT-2), α -1, 3 fucosyltransferase (FUT3) and A and B enzymes, which are coded by three main HBGA gene families, resulting in ABO (A, B and/or H antigens), Lewis (Lewis a, b, x and/or y antigens) and secretor/non-secretor HBGA phenotypes [16]. The expression of these phenotypes are genetically determined and depend on individual HBGA genotypes, which are influenced by the composition and genetic diversity of the human population [6]. A mutation on both alleles of the *FUT2* gene leads to inactivation of the corresponding FUT2 enzyme, and individuals possessing such polymorphism are termed non-secretors. Similarly, individuals with null alleles for the *FUT3* gene do not produce Lewis antigens, and are denominated Lewis negative [6].

Genetic susceptibility to norovirus infection mediated by HBGA polymorphisms has been a known phenomenon for decades and, despite solid scientific evidence regarding the association between the norovirus infection, particularly with the predominant GII.4 genotype, and the secretor status, the exact role of the Lewis antigen as a susceptibility mediator remains to be better clarified [17–19].

Less than a decade ago, *in vitro* studies showing the binding of the VP8* domain of the spike protein VP4 of rotavirus to HBGA paved the way for the development of epidemiological evaluations to understand the effect of HBGA differential expression in susceptibility to rotavirus infection [14,15]. These epidemiological studies conducted in different countries including France, Vietnam, Burkina Faso, USA, China, and Spain pointed to the same conclusion that children of the secretor phenotype were significantly more prone to suffer from diarrhea caused by P[8] and P[4] rotavirus compared to the non-secretor [20–25]. However, conflicting results were observed in studies conducted with children from Tunisia, where P[8] strains were found infecting both individuals of secretor and non-secretor phenotypes, and more recently in Bangladesh, where the non-secretor children were not protected from diarrhea caused by the P[8] genotype [26,27]. These inconsistencies suggest the need for more epidemiological studies in different populations to better understand the role of HBGA phenotypes in rotavirus infection.

In Brazil, a continental-sized country with a highly genetically admixed population, few studies have analyzed the association between norovirus infection and HBGA phenotypes [28,29] and there are no data yet available regarding rotavirus infection and disease. Therefore, this study aimed to analyze the association between rotavirus and norovirus symptomatic infection and HBGA phenotypes, in addition to *FUT2* and *FUT3* genes polymorphisms, in children from Southeastern Brazil. In the present study, we were able to reinforce the current knowledge that secretors are more susceptible

than non-secretors to infection by both rotavirus and norovirus, and that the combination of *FUT3* polymorphisms found may reflect the highly mixed Brazilian population.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population and Samples

Fecal and buccal swabs specimens were collected from 272 children up to 12 years old enrolled during a surveillance study of sporadic cases of acute gastroenteritis carried out in two periods (October 2014 to July 2016 and September 2017 to September 2018) in the Southeastern Brazilian coastal state of Espírito Santo. Among these children, 196 (72.1%) had received rotavirus vaccination, of which 92.9% (182/196) were fully vaccinated (179 received Rotarix[®] and three RotaTeq[®]) and the other 14 were partially vaccinated with Rotarix[®]. Twenty-seven (10%) children were unvaccinated and for 49 children (18%) the vaccination status was not available. These children were admitted to a pediatric hospital and an urgent care center situated in the city of Vitória (state capital). During their admission, they were invited to participate in the study and samples were obtained after the signature of a consent form by the person responsible for the patient. The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee of the Center of Health Sciences of the Federal University of Espírito Santo (N^o 1.312.166; 6 November 2015).

The passage of three or more loose or watery stools during a 24 h period with up to 14 days of duration was considered acute diarrhea [30].

2.2. Rotavirus and Noroviruses Detection

Viral RNA was extracted from 10% fecal suspensions (*w/v*) using the QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Noroviruses were detected by RT-qPCR using primers and a probe targeting the ORF1/2 junction [31,32]. Rotavirus detection was performed either by an Enzyme immunoassay (ELISA) (Ridascreen[®], R-Biopharm, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's recommendation, or by RT-qPCR, with primers and a probe specific to amplifying a conserved region of the non-structural protein 3 (NSP3) of the virus [33].

2.3. Rotavirus P Typing and Noroviruses Genotyping

Rotavirus P types were determined from positive samples with specific primers for a fragment of the VP4 gene, followed by sequencing [34]. For noroviruses genotyping, positive samples were initially amplified by PCR using a set of primers targeting a 570 bp fragment encompassing the 3'-end ORF1 and 5'-end ORF2 and then sequenced [35,36]. Sequencing for both viruses was carried out with ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The noroviruses' genotype was ascribed using the Norovirus Automated Genotyping Tool version 2.0, (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) [37]. The 33 VP4 sequences of rotavirus were deposited on GenBank under the accession numbers MT597424 and MT602430-MT602461. As to norovirus, the 46 ORF-1/2 sequences were deposited on GenBank under the accession numbers KY451971-KY451984, MF158177-MF158179, MF158185-MF158199 [38], MT613346-MT613358, and MT626025.

2.4. Histo-Blood Group Antigens Phenotyping

HBGAs phenotypes were determined from buccal swabs specimens by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described elsewhere [39]. Buccal swabs immersed in phosphate-buffered saline (PBS) were first boiled for 10 min, and then used at a dilution of 1:50 in a 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) to coat 96-well microtiter plates (Maxisorp Nunc-Immuno plates, Thermo Scientific, Roskilde, Denmark), which were then incubated overnight at 4 °C. The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20, and blocked with PBS containing 5% nonfat milk (5% milk/PBS) for 1 h at

37 °C. Primary anti-carbohydrate monoclonal antibodies anti-A (3-3A), anti-B (B49), anti-Le^a (7LE) and anti-Le^b (2-25LE) (Thermo Scientific) diluted at 1:400 in 5% milk/PBS were added and incubated for 1 h at 37 °C. At this step, the lectin UEA-1 (“Ulex Europaeus Agglutinin I”–Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) conjugated with biotin was also used to detect the H antigen. After three washes, peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin diluted at 1:2000 in 5% milk/PBS and peroxidase-conjugated Streptavidin (Vector Laboratories) diluted at 1:500 in 5% milk/PBS were then added and incubated for 1 h at 37 °C. After the last three washes, reactions were developed with a 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine kit (BD OptEIA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and the optical density was read at 450 nm. Previously well-defined A, B, O, secretor, and Lewis type saliva samples were included in each plate as controls. The cutoff value was defined as a twofold increase in absorbance value compared to the mean of two negative control samples (wells with only PBS). The distribution of ABO blood groups, H type 1 antigen (FUT-2), and Lewis antigens were determined between diarrheic children of the same ages and geographic area infected and non-infected by rotavirus and norovirus.

2.5. FUT2 and FUT3 Genotyping

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *FUT2* and *FUT3* genes were investigated as described below. Genomic DNA from buccal swabs specimens was extracted with the NucleoSpin®Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer’s instructions. For *FUT2* genotyping, a 195-bp *FUT2* gene fragment was initially amplified by PCR and then digested with the enzyme Ava-II, as previously described [39]. This method enables detection of the common G428A *FUT2* mutation as it abrogates the restriction site of the enzyme. For genotyping of the Lewis (*FUT3*) gene mutations, four gene fragments encompassing the worldwide common mutations C314T, G508A, and T1067A were amplified by real-time PCR and submitted to Sanger DNA sequencing, except for mutations T59G and T202C, which were searched for by conventional PCR using sequence-specific primers [40]. For the latter two mutations, a human growth hormone (hGH) gene amplification was performed as an internal control in each round of PCR [41]. The *FUT3* sequences involving the C314T/G508A mutations were deposited on GenBank under the accession numbers MT656016-MT656059 and the *FUT3* sequences encompassing T1067A mutation were deposited on GenBank under the accession numbers MT725617-MT725659.

2.6. Statistical Analysis

Analysis of categorical data was done with the Fisher exact test, with two-tailed significance using the GraphPad software. A *p* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Rotavirus and Noroviruses Detection on Children with Acute Diarrhea

Of the 272 children presenting acute diarrhea, 35 (12.9%) and 65 (23.9%) had rotavirus and norovirus infections, respectively (Table 1). Rotavirus and norovirus coinfection was detected in only one child. The age distribution of rotavirus and noroviruses infection can be observed in Table 1.

Table 1. Distribution of children infected with rotavirus and noroviruses according to age groups.

Age	Number of Samples N (%)	Rotavirus+ N (%)	Norovirus+ N (%)	Negative N (%)
≤12 m	99 (36.4)	9 (9.1)	33 (33.3)	57 (57.6)
>12 m–2 y	78 (28.7)	9 (11)	20 (25)	50 (64)
>2–5 y	61 (22.4)	13 (21.3)	9 (14.7)	39 (64)
>5 y	34 (12.5)	5 (14.7)	3 (8.8)	26 (76.5)
Total	272	35 (12.9)	65 (23.9)	172 (63.2)

Abbreviations: m, months; y, years; Rotavirus+, rotavirus infected children; Norovirus+, norovirus infected children.

3.2. Rotavirus and Noroviruses Genotyping

The P[8] genotype predominated (30/35; 85.7%) among the rotavirus positive samples, while two (5.7%) belonged to the P[4] genotype and three was P[X]. All the P[8] strains belonged to lineage 3.

Sixty-one out of 65 (93.8%) positive samples for noroviruses belonged to GII, 4.6% to GI, and in one sample (1.5%), both GI and GII were detected. Genotypes were successfully established for 46 samples, and the majority (76%) was represented by the GII.4 Sydney variant (Table 2).

Table 2. Noroviruses VP1 gene genotyping.

VP1	Strains N (%)
GI.7	1 (2.2)
GI.4 Sydney	35 (76)
GII.17	5 (10.9)
GII.3	2 (4.3)
GII.1	1 (2.2)
GII.2	1 (2.2)
GII.6	1 (2.2)

3.3. HBGA Phenotypes among Rotavirus and Norovirus Infected Children

Rotavirus predominantly infected children with secretor status (34/35; 97%). The only non-secretor infected child was infected by a P[8] strain. In comparison, 82% (141) of the negative group, which was used as a control group, were secretors, and 18% (31) were non-secretors ($p = 0.0207$) (Table 3). There was no statistical difference between the distribution of Lewis status and ABO blood types among rotavirus infected children compared to the control group (Table 3). Although we observed a lower frequency of Lewis negative children in the infected group as compared with the control group (8.6% vs. 18.5%), the difference was not statistically significant, likely owing to the limited number of cases.

Table 3. Distribution of histo-blood group antigens (HBGAs) phenotypes between children infected with rotavirus/noroviruses and the negative control group.

HBGA Phenotype	Total N (%)	Rotavirus+ N (%)	Norovirus+ N (%)	Negative Control Group N (%)	p Value	
					Rotavirus+	Norovirus+
Secretor status						
Se	239 (87.9)	34 (97)	64 (98.5)	141 (82)	0.0207	0.0004
se	33 (12.1)	1 (3)	1 (1.5)	31 (18)		
Lewis phenotype						
Le ⁺	225 (82.5)	32 (91.4)	53 (81.5)	140 (81.4)	0.2154	1.0000
Le ⁻	47 (17.1)	3 (8.6)	12 (18.5)	32 (18.6)		
Blood groups						
O	128 (53.6)	15 (44)	39 (61)	74 (52.5)		
A	72 (30.1)	11 (32.4)	19 (29.7)	42 (29.8)	0.4464	0.2907
B	31 (13)	6 (17.6)	4 (6.2)	21 (14.9)		
AB	8 (3.3)	2 (6)	2 (3.1)	4 (2.8)		

Abbreviations: Le⁺, Lewis-positive (Lewis a and/or b positive); Le⁻, Lewis-negative (Lewis a and b negative); Norovirus+, norovirus infected children; Rotavirus+, rotavirus infected children; Se, secretor; se, non-secretor.

The HBGA secretor phenotype was observed in 64 out of 65 (98.5%) children infected with norovirus, and one infected child (1.5%) had the non-secretor phenotype. Conversely, in the negative control group, 31 out of 172 (18%) children were non-secretors and the difference between the number of non-secretors in cases and controls was statistically significant ($p = 0.0004$) (Table 3). There was no difference in the distribution of ABO blood groups and Lewis status between the norovirus

infected individuals and the control group (Table 3). Analysis of HBGA phenotypes stratified by norovirus genotypes showed that all 35 GII.4 strains infected only children with secretor status, and the non-secretor patient was infected by a GII.3 strain (Table 4). The three GI viruses infected the secretor Lewis-positive children, whereas the GII genogroup infected both the secretor Lewis-negative and Lewis-positive children (Table 4).

Table 4. Distribution of histo-blood group antigen phenotypes in relation to noroviruses genogroup and genotypes among children infected with noroviruses in Espírito Santo state, Brazil.

Norovirus Genogroup/Genotype	N	Blood Groups				Lewis Phenotypes			Secretor Status	
		O	A	B	AB	Le ^{a-b+}	Le ^{a-b-}	Le ^{a+b-}	Secretor	Non-Secretor
G.I *	3	1	1	1	-	3	-	-	3	-
G.II	61	39	15	4	2	50	10	1	60	1
GII.1	1	1	-	-	-	1	-	-	1	-
GII.2	1	1	-	-	-	1	-	-	1	-
GII.3	2	-	1	-	-	1	-	1	1	1
GII.4	35	24	9	1	1	27	8	-	35	-
GII.6	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-
GII.17	5	2	3	-	-	3	2	-	5	-
GII *	16	11	1	3	1	16	-	-	16	-
G.I and G.II	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-

Abbreviations: Le^{a-b+}, Lewis a negative and Lewis b positive; Le^{a-b-}, Lewis-negative (Lewis a and b negative); Le^{a+b-}, Lewis a positive and Lewis b negative. * Refers to strains with undetermined genotypes.

3.4. FUT2 and FUT3 Genotyping

Secretor and non-secretor phenotypes determined by ELISA for both the rotavirus and norovirus infected and the negative control groups were confirmed by *FUT2* genotyping based on the G428A mutation. All non-secretors ($N = 33$) from both the infected and negative groups were homozygous carriers of the *FUT2* G428A nonsense mutation (Table 5). The difference in the number of patients with the non-secretor genotype (se^{428}/se^{428}) among the rotavirus/norovirus infected groups compared to the negative control group was statistically significant (rotavirus: $p = 0.0207$; norovirus: $p = 0.0004$) (Table 5).

Table 5. Distribution of *FUT-2* genotypes among infected patients and controls according to G428A mutation.

<i>FUT-2</i> Genotype	Total N (%)	Rotavirus+ N (%)	Norovirus+ N (%)	Negative Control Group N (%)	<i>p</i> Value	
					Rotavirus+	Norovirus+
SE/SE	99 (36.4)	11 (31.4)	33 (50.8)	55 (32)	0.0207	0.0004
SE/ se^{428}	140 (51.5)	23 (65.7)	31 (47.7)	86 (50)		
se^{428}/se^{428}	33 (12.1)	1 (2.9)	1 (1.5)	31 (18)		

Abbreviations: *FUT-2*, fucosyltransferase 2 gene; SE/SE, homozygote secretor; SE/ se^{428} , heterozygote secretor; se^{428}/se^{428} , non-secretor genotype; Norovirus+, norovirus infected children; Rotavirus+, rotavirus infected children.

To confirm the Lewis-negative phenotype (Le a and b negative), all 47 samples from children with this phenotype were submitted to *FUT3* gene genotyping, which included the analysis of the common SNPs T59G, T202C, C314T, G508A, and T1067A, and 45 of them were genotypically confirmed as Lewis negative. The most common polymorphism was the T59G with an overall frequency of 86.6% (39/45), followed by the G508A, T202C and C314T SNPs with frequencies of 77.2%, 53.3% and 50%, respectively (Table 6). By contrast, the T1067A SNP was the rarest, with a frequency of 4.6% (2/43), including one homozygote and one heterozygote (Table 6). The frequencies of all SNP analyzed for the *FUT3* gene are shown in Table 7. The two samples with undetermined Lewis genotype had only one heterozygote allele among the investigated mutations. Homozygotes alleles for more than one of the T59G, T202C, C314T, G508A, T1067A mutations were observed in eight individuals, and there were

also eight homozygotes for only one mutation. The remaining 29 patients were heterozygote for at least two of the evaluated mutations (Table 7).

Table 6. Frequencies of polymorphisms on *FUT-3* gene in Lewis negative children.

SNP	Frequency, N (%)			Total
	Mutant Homozygotes	Heterozygotes	Wild Type Homozygotes	
G508A	10 (22.7)	24 (54.6)	10 (22.7)	44 ^a
T59G	8 (17.8)	31 (68.9)	6 (13.3)	45
T202C	3 (6.6)	21 (46.7)	21 (46.7)	45
C314T	2 (4.5)	20 (45.5)	22 (50)	44 ^a
T1067A	1 (2.3)	1 (2.3)	41 (95.4)	43 ^a

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism. ^a One sequence for one patient for mutations G508A and C314T, and two sequences for T1067A could not be determined.

Table 7. *FUT3* alleles frequencies observed in South-eastern Brazilian children.

<i>FUT3</i> Allele	Frequency, N (%)
<i>Lel</i> ^{59,202,314,508}	13 (31)
<i>Lel</i> ^{59,508}	11 (26)
<i>Lel</i> ^{202,314}	4 (9.5)
<i>Lel</i> ^{59,202,314,1067}	1 (2.4)
<i>Lel</i> ^{59,202,314}	1 (2.4)
<i>Lel</i> ^{59,202}	1 (2.4)
<i>le</i> ⁵⁰⁸ <i>le</i> ^{59,508}	5 (11.9)
<i>le</i> ⁵⁹ <i>le</i> ^{59,508}	2 (4.8)
<i>le</i> ^{59,1067} <i>le</i> ^{59,202,1067}	1 (2.4)
<i>le</i> ²⁰² <i>le</i> ^{59,202,314}	1 (2.4)
<i>le</i> ^{59,508} <i>le</i> ^{59,508}	1 (2.4)
<i>le</i> ^{202,314} <i>le</i> ^{202,314}	1 (2.4)

Abbreviations: *Le*, Lewis wild-type allele; *le*, Lewis mutant allele.

4. Discussion

The interaction of rotavirus with HBGA has gained importance in the last years, with the discovery of VP8* binding to these glycans [14,15]. Studies have shown that this interaction is P genotype-specific, similar to that observed for VP1 of human noroviruses, and that the susceptibility or resistance to both viruses is largely dependent on the presence or absence of HBGA on gut epithelial surfaces. In addition, the association between the secretor status and infection, initially demonstrated for noroviruses, has also been shown by recent studies for rotavirus, which has demonstrated a correlation between infection and the presence of a functional FUT2 phenotype [23,42–44].

In this study, we have shown the association between the HBGA secretor status and rotavirus and noroviruses infection in Brazilian children, a finding that is consistent with previous epidemiological investigations worldwide [18,20–25]. Our data add further support to this notion and contribute to the understanding of this association in a highly mixed population like the Brazilian one.

Due to the circulation of emerging P[8]-4 strains [45] with distinct glycan-binding patterns that allow non-secretors to be more prone to infection [46], we searched for possible mutations on the VP8* glycan-binding amino acid sequence of the P[8] strain that infected the non-secretor patient in our study. The analysis of the patient's VP8* P[8], as well as of the other P[8] strains (all classical P[8]-3 strains) detected in the study, did not demonstrate variations both on conserved and non-conserved residues, compared to other classical P[8] strains detected in the world. Thus, variations on VP8* could not explain the patient's infection. One hypothesis is that this child was poorly immunized, possibly in part because of his HBGA status (non-secretor), and also because he received only one dose of the

Rotarix[®] vaccine. Later on, the patient may have ingested a large dose of the virus and became ill. We are not dealing with an all or nothing phenomenon and amounts likely matter. This could well be a difference between countries or regions concerning the quality of sanitation and hygiene.

P[8] and P[4] rotavirus genotypes cause more than 90% of the pediatric diarrhea cases in the world, including in Brazil [47]. These data are consistent with those observed in the present study in which all the rotavirus detected belonged to these two genotypes. The fact that P[8] and P[4] genotypes recognize Le^b and H type 1 antigens, expressed only in secretor individuals, may explain the worldwide predominance of these genotypes [24,48]. Although the frequency of the secretor phenotype varies across populations, approximately 80% of the world population are secretors [16]. In Brazil, the prevalence of this phenotype revealed in the few studies, is somewhat similar, ranging from 75% to 90% [28,49–51]. The 82% of secretors in the control group found in the present study were therefore consistent with these previous observations. The most common *FUT2* mutation, G428A, was observed in all non-secretor children in our study, which contrasts with a recent study performed in North of South America with Amazonian children from Brazil, Venezuela, and English Guyana, where this common *FUT2* gene mutation was not detected [50]. These results highlight the importance of studying the influence of *FUT2* polymorphisms on susceptibility to enteric viruses in populations of different geographic locations, such as those from Latin America.

Apart from studying the susceptibility to natural rotavirus infection, some studies have been focused on the role of HBGA on the rotavirus vaccine response. In this regard, some argue that the differential efficacy of the two main rotavirus vaccines (Rotarix[®] and RotaTeq[®]) between low-income and high-income countries may be linked to the different HBGA expression in the population. Indeed, higher vaccine take has been observed in children with the secretor phenotype, compared to non-secretors [43,52,53]. Interestingly, in a recent study assessing the association of rotavirus shedding and the HBGA profile in a birth community-cohort in Rio de Janeiro, Brazil, a mutation in the 167 position of the VP8* P[8] gene was detected in many samples characterized as Rotarix[®] strain (RV1) [54]. Moreover, Le^{a+b+} secretor children were significantly more likely to shed this mutant strain compared to non-secretors. Based on these results, it was suggested that the RV1-vaccine replication triggered by this mutational event led to a more robust immune response in these children [54].

In our study, the majority (72%) of the children were vaccinated against rotavirus, particularly with Rotarix[®], and this may be considered as introducing a bias, since one may expect non-secretors to be less well vaccinated than secretors. However, rotavirus infected children are still mostly secretors indicating that no such bias occurred, either the secretor status may not have been an important factor in determining vaccine efficacy, or that the most important factor is the genetic susceptibility at the time of infection.

The globally predominant norovirus genotype GII.4, detected in most of our samples (76%), infected only children with the secretor phenotype. These results further confirm the secretor specificity of the GII.4 genotype previously observed through epidemiological studies conducted in different countries such as Burkina Faso, China, Ecuador, USA, Nicaragua, and Vietnam [18,21,55–58]. Furthermore, among the GII.4, all belonged to the GII.4 Sydney variant which has already been shown to be secretor-specific [18]. Although still unclear, the reasons for the global dominance of GII.4 are at least partially linked to its HBGA-binding characteristics. GII.4 strains bind to glycans of all secretor-positive individuals, irrespective of their ABO and Lewis phenotypes. Moreover, as previously suggested, an increased affinity of HBGA to some of the more recent GII.4 variants may have contributed to the epidemiological dominance of these variants [59]. It is conceivable that these features, in addition to the high prevalence of secretor-positive individuals in the world population, would provide a broad spectrum of susceptible hosts worldwide and affect GII.4 infection.

Regarding the non-GII.4 norovirus genotypes, all but one was found among the infected secretor-positive children, although we detected GII.1 and GII.2 genotypes capable of infecting non-secretors to a similar extent as secretors [57,60]. The only non-secretor child was infected with the GII.3 norovirus genotype. In fact, this genotype has been reported to infect both secretors and non-secretors, and although

some studies indicate that the secretors are more prone to infection by that genotype, the association is not as strong as that observed for the GII.4 genotype [21,61].

We observed a trend towards the occurrence of rotavirus infection on secretor Lewis positive children (91.4%), without reaching statistical significance, probably due to the low number of rotavirus cases. This result is similar to that obtained in an epidemiological study conducted in Burkina Faso and Nicaragua that showed that no secretor/Lewis negative child with diarrhea was infected by P[8] [22]. Moreover, previous studies suggest that both the Lewis b and secretor antigens are required for P[8] and P[4] VP8* binding [24,48,62]. On the other hand, recent structural studies involving P[8] VP8* binding to HBGA presented conflicting results. While some indicate the additional fucose conferred by the Lewis b antigen would cause steric hindrance to the interaction, other studies demonstrated binding of P[8] VP8* to the Lewis b antigen via a pocket formed by two β -sheets [63–65]. Further studies are warranted to clarify this issue.

Overall, the results of the Lewis phenotyping revealed that the Lewis status (positive/negative) is not a mediator of susceptibility to norovirus infection, an observation consistent with previous studies [55,58,66]. Nevertheless, one study from Taiwan observed that the Lewis antigen-positive genotype was a protective factor against severe norovirus gastroenteritis [67]. In addition, while the three norovirus GI infected only Lewis-positive children, the norovirus GII infected both Lewis-negative and Lewis-positive children, similar to previous findings from Burkina Faso [55]. In favor of the GI's preference to infect Lewis-positive individuals, Kubota and colleagues demonstrated a structural basis for the recognition of Lewis antigens by the GI norovirus [68]. Unfortunately, due to the limited number of GI positive samples, we could not evaluate the Lewis effect for individual genotypes.

The frequency of 17.1% of Lewis-negative individuals observed in the present study is higher than that registered in people of European descent such as in Scandinavia (5.7%), Spain (6%), and Portugal (10%) [25,66,69]. Nevertheless, the frequency of this phenotype in the highly mixed Brazilian population is similar to other countries of the American continent including Colombia (22%) and Nicaragua (25%), and can reach up to 32% in some African populations [22,58,70]. Among the Lewis negative individuals, four main SNP were identified at positions T59G, G508A, T202C, and C314T. These results are in agreement with a study conducted with an Amazonian population, and a recent birth community-cohort in Rio de Janeiro, in which these SNPs were detected with similar frequencies [29,71]. In addition, the combination of SNPs found in the present study are also known to occur in Asian, African, and European populations, with the T59G and G508A being more frequent in the first two continents, and the T202C and C314T in the latter [72–74].

5. Conclusions

Our findings add to the existing knowledge that children with an *FUT2* secretor status are indeed more susceptible to both rotavirus and norovirus symptomatic infection, compared to non-secretors, and contribute to improving the understanding of the host susceptibility to these viruses and their epidemiology in Latin America. Moreover, the high rate for Lewis negative and the combination of SNPs, beyond the secretor status, may reflect the highly mixed population from Brazil, and, to some extent, restrict the infection by rotavirus but not by norovirus. New studies in populations with distinct ethnicities from Brazil and other countries of the South American continent are still warranted to better evaluate the impact of *FUT2* and *FUT3* polymorphisms on rotavirus and norovirus susceptibility.

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

Funding: This research was funded by Espírito Santo Research Foundation (FAPES)/National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Department of Science and Technology (Decit)—Secretary of Science Technology and Strategic Inputs (SCTIE)—Health Ministry (MS)/Health’s Secretary (SESA) (no. 65711670–2014 PPSUS). This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil (CAPES)-Finance Code 001.

Acknowledgments: We are grateful to Lucas Luis Meigre Dias Pereira, Núbia Gonçalves, Thainá Bezerra Rubens and Willamis Soares Franqueta for helping during sample collection and laboratory analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 1211–1228.
2. Troeger, C.; Khalil, I.A.; Rao, P.C.; Cao, S.; Blacker, B.F.; Ahmed, T.; Armah, G.; Bines, J.E.; Brewer, T.G.; Colombara, T.V.; et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatrics* **2018**, *172*, 958–965. [PubMed]
3. Burnett, E.; Jonesteller, C.L.; Tate, J.E.; Yen, C.; Parashar, U.D. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 1666–1672. [PubMed]
4. International Vaccine Access Center (IVAC). Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Available online: <http://www.view-hub.org/viz/> (accessed on 12 February 2020).
5. Jonesteller, C.L.; Burnett, E.; Yen, C.; Tate, J.E.; Parashar, U.D. Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 840–850.
6. Le Pendu, J.; Ruvoën-Clouet, N. Fondness for sugars of enteric viruses confronts them with human glycans genetic diversity. *Hum. Genet.* **2019**, 1–8. [CrossRef]
7. Velasquez, D.E.; Parashar, U.; Jiang, B. Decreased performance of live attenuated, oral rotavirus vaccines in low-income settings: Causes and contributing factors. *Expert Rev. Vaccines* **2018**, *17*, 145–161.
8. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed on 9 May 2020).
9. Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Available online: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg> (accessed on 5 February 2020).
10. Mans, J. Norovirus infections and disease in lower-middle and low-income countries, 1997–2018. *Viruses* **2019**, *11*, 341. [CrossRef]
11. Parra, G.I. Emergence of norovirus strains: A tale of two genes. *Virus Evol.* **2019**, *5*. [CrossRef]
12. 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.
13. Marionneau, S.; Ruvoën, N.; Le Moullac-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.
14. Hu, L.; Crawford, S.E.; Czako, R.; Cortes-Penfield, N.W.; Smith, D.F.; Le Pendu, J.; Estes, M.K.; Prasad, B.V. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with a-type histo-blood group antigen. *Nature* **2012**, *485*, 256–259. [CrossRef]
15. Huang, P.; Xia, M.; Tan, M.; Zhong, W.; Wei, C.; Wang, L.; Morrow, A.; Jiang, X. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* **2012**, *86*, 4833–4843. [CrossRef] [PubMed]
16. Le Pendu, J.; Nyström, K.; Ruvoën-Clouet, N. Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *7*, 88–94. [CrossRef]
17. Thorven, M.; Grahn, A.; Hedlund, K.O.; Johansson, H.; Wahlfrid, C.; Larson, G.; Svensson, L. A homozygous nonsense mutation (428G→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J. Virol.* **2005**, *79*, 15351–15355. [CrossRef] [PubMed]

18. 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](#)] [[PubMed](#)]
19. Nordgren, J.; Svensson, L. Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. *Viruses* **2019**, *11*, 226. [[CrossRef](#)]
20. Imbert-Marcille, B.M.; Barbé, L.; Dupé, M.; Le Moullac-Vaidye, B.; Besse, B.; Peltier, C.; Ruvoën-Clouet, N.; Le Pendu, J. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus a of the P [8] genotype. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 1227–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Van Trang, N.; Vu, H.T.; Le, N.T.; Huang, P.; Jiang, X.; Anh, D.D. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1366–1374. [[CrossRef](#)]
22. Nordgren, J.; Sharma, S.; Bucardo, F.; Nasir, W.; Günaydin, G.; Ouermi, D.; Nitiema, L.W.; Becker-Dreps, S.; Simpre, J.; Hammarström, L.; et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 1567–1573. [[CrossRef](#)]
23. Payne, D.C.; Currier, R.L.; Staat, M.A.; Sahni, L.C.; Selvarangan, R.; Halasa, N.B.; Englund, J.A.; Weinberg, G.A.; Boom, J.A.; Szilagyi, P.G.; et al. Epidemiologic association between FUT2 secretor status and severe rotavirus gastroenteritis in children in the united states. *JAMA Pediatrics* **2015**, *169*, 1040–1045.
24. Zhang, X.F.; Long, Y.; Tan, M.; Zhang, T.; Huang, Q.; Jiang, X.; Tan, W.F.; Li, J.D.; Hu, G.F.; Tang, S.; et al. P[8] and P[4] rotavirus infection associated with secretor phenotypes among children in south China. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pérez-Ortín, R.; Vila-Vicent, S.; Carmona-Vicente, N.; Santiso-Bellón, C.; Rodríguez-Díaz, J.; Buesa, J. Histo-blood group antigens in children with symptomatic rotavirus infection. *Viruses* **2019**, *11*, 339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ayouni, S.; Sdiri-Loulizi, K.; de Rougemont, A.; Estienne, M.; Ambert-Balay, K.; Aho, S.; Hamami, S.; Aouni, M.; Neji-Guediche, M.; Pothier, P.; et al. Rotavirus P[8] infections in persons with secretor and nonsecretor phenotypes, tunisia. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2055–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lee, B.; Dickson, D.M.; de Camp, A.C.; Ross Colgate, E.; Diehl, S.A.; Uddin, M.I.; Sharmin, S.; Islam, S.; Bhuiyan, T.R.; Alam, M.; et al. Histo-blood group antigen phenotype determines susceptibility to genotype-specific rotavirus infections and impacts measures of rotavirus vaccine efficacy. *J. Infect. Dis.* **2018**, *217*, 1399–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vicentini, F.; Denadai, W.; Gomes, Y.M.; Rose, T.L.; Ferreira, M.S.; Le Moullac-Vaidye, B.; Le Pendu, J.; Leite, J.P.; Miagostovich, M.P.; Spano, L.C. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected quilombola children in espirito santo state, Brazil. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69348. [[CrossRef](#)]
29. Cantelli, C.P.; Fumian, T.M.; Malta, F.C.; da Cunha, D.C.; Brasil, P.; Nordgren, J.; Svensson, L.; Miagostovich, M.P.; de Moraes, M.; Leite, J. Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, rio de janeiro, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *82*, 104280. [[CrossRef](#)]
30. World Health Organization. The Treatment of Diarrhoea: A Manual for Physicians and Other Senior Health Workers. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43209> (accessed on 25 February 2020).
31. Fumian, T.M.; de Andrade, J.S.R.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in southern Brazil 2004–2011. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145391. [[CrossRef](#)]
32. Kageyama, T.; Kojima, S.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Fukushi, S.; Hoshino, F.B.; Takeda, N.; Katayama, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1548–1557. [[CrossRef](#)]
33. Zeng, S.Q.; Halkosalo, A.; Salminen, M.; Szakal, E.D.; Puustinen, L.; Vesikari, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods* **2008**, *153*, 238–240. [[CrossRef](#)]
34. Gentsch, J.R.; Glass, R.I.; Woods, P.; Gouvea, V.; Gorziglia, M.; Flores, J.; Das, B.K.; Bhan, M.K. Identification of group a rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 1365–1373. [[CrossRef](#)]
35. Beuret, C.; Kohler, D.; Baumgartner, A.; Lüthi, T.M. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: One-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1925–1931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kojima, S.; Kageyama, T.; Fukushi, S.; Hoshino, F.B.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Natori, K.; Takeda, N.; Katayama, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* **2002**, *100*, 107–114. [[CrossRef](#)]

37. Kroneman, A.; Vennema, H.; Deforche, K.; v d Avoort, H.; 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](#)] [[PubMed](#)]
38. Barreira, D.; Fumian, T.M.; Tonini, M.; Volpini, L.; Santos, R.P.; Ribeiro, A.; Leite, J.; Souza, M.; Brasil, P.; da Cunha, D.C.; et al. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189504. [[CrossRef](#)]
39. Marionneau, S.; Airaud, F.; Bovin, N.V.; Le Pendu, J.; Ruvoën-Clouet, N. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to norwalk virus attachment. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1071–1077.
40. Grahn, A.; Elmgren, A.; Aberg, L.; Svensson, L.; Jansson, P.A.; Lönnroth, P.; Larson, G. Determination of lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum. Mutat.* **2001**, *18*, 358–359.
41. Procter, J.; Crawford, J.; Bunce, M.; Welsh, K.I. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. *Tissue Antigens* **1997**, *50*, 475–483. [[CrossRef](#)]
42. Günaydin, G.; Nordgren, J.; Sharma, S.; Hammarström, L. Association of elevated rotavirus-specific antibody titers with HBGA secretor status in Swedish individuals: The FUT2 gene as a putative susceptibility determinant for infection. *Virus Res.* **2016**, *211*, 64–68. [[CrossRef](#)]
43. Armah, G.E.; Cortese, M.M.; Dennis, F.E.; Yu, Y.; Morrow, A.L.; McNeal, M.M.; Lewis, K.; Awuni, D.A.; Armachie, J.; Parashar, U.D. Rotavirus vaccine take in infants is associated with secretor status. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 746–749. [[CrossRef](#)]
44. Bucardo, F.; Reyes, Y.; Rönnelid, Y.; González, F.; Sharma, S.; Svensson, L.; Nordgren, J. Histo-blood group antigens and rotavirus vaccine shedding in nicaraguan infants. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10764. [[CrossRef](#)]
45. Zeller, M.; Heylen, E.; Damanka, S.; Pietsch, C.; Donato, C.; Tamura, T.; Kulkarni, R.; Arora, R.; Cunliffe, N.; Maunula, L. Emerging OP354-Like P[8] rotaviruses have rapidly dispersed from asia to other continents. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 2060–2071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Khachou, A.; Le Moullac-Vaidye, B.; Peltier, C.; Breiman, A.; Imbert-Marcille, B.M.; Ruvoen-Clouet, N.; Aouni, M.; Mastouri, M.; Chouchane, S.; Le Pendu, J. Host-range shift between emerging P[8]-4 rotavirus and common P[8] and P[4] strains. *J. Infect. Dis.* **2020**, *222*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Carvalho-Costa, F.A.; de Assis, R.; Fialho, A.M.; Araújo, I.T.; Silva, M.F.; Gómez, M.M.; Andrade, J.S.; Rose, T.L.; Fumian, T.M.; Volotão, E.M.; et al. The evolving epidemiology of rotavirus a infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. *BMC Pediatrics* **2019**, *19*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ma, X.; Li, D.D.; Sun, X.M.; Guo, Y.Q.; Xiang, J.Y.; Wang, W.H.; Zhang, L.X.; Gu, Q.J.; Duan, Z.J. Binding patterns of rotavirus genotypes P[4], P[6], and P[8] in China with histo-blood group antigens. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bernardo, C.R.; Camargo, A.; Ronchi, L.S.; de Oliveira, A.P.; de Campos Júnior, E.; Borim, A.A.; Brandão de Mattos, C.C.; Bestetti, R.B.; de Mattos, L.C. ABO, secretor and lewis histo-blood group systems influence the digestive form of chagas disease. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *45*, 170–175. [[CrossRef](#)]
50. de Moraes, M.; Olivares, A.; Fialho, A.M.; Malta, F.C.; da Silva, E.; Mouta Junior, S.; de Souza Bispo, R.; Velloso, A.J.; Alves Leitão, G.A.; Cantelli, C.P.; et al. Phenotyping of lewis and secretor HBGA from saliva and detection of new FUT2 gene SNPs from young children from the amazon presenting acute gastroenteritis and respiratory infection. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *70*, 61–66. [[CrossRef](#)]
51. Nakashima, F.; Brandão de Mattos, C.C.; Ferreira, A.; Spergiorin, L.; Meira-Strejevitch, C.S.; Oliani, A.H.; Vaz-Oliani, D.; Pereira-Chiocola, V.L.; de Mattos, L.C. FUT3 and FUT2 genotyping and glycoconjugate profile Lewis b as a protective factor to toxoplasma gondii infection. *Acta Trop.* **2019**, *193*, 92–98. [[CrossRef](#)]
52. Kazi, A.M.; Cortese, M.M.; Yu, Y.; Lopman, B.; Morrow, A.L.; Fleming, J.A.; McNeal, M.M.; Steele, A.D.; Parashar, U.D.; Zaidi, A.; et al. Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 786–789. [[CrossRef](#)]
53. Bucardo, F.; Nordgren, J.; Reyes, Y.; Gonzalez, F.; Sharma, S.; Svensson, L. The Lewis a phenotype is a restriction factor for rotateq and rotarix vaccine-take in nicaraguan children. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1502. [[CrossRef](#)]

54. Cantelli, C.P.; Velloso, A.J.; Assis, R.; Barros, J.J.; Mello, F.; Cunha, D.; Brasil, P.; Nordgren, J.; Svensson, L.; Miagostovich, M.P.; et al. Rotavirus shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, rio de janeiro, Brazil, 2014–2018. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
55. Nordgren, J.; Nitiema, L.W.; Ouermi, D.; Simporé, J.; Svensson, L. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in burkina faso. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, P.; Wang, X.; Lee, J.C.; Teunis, P.; Hu, S.; Paradise, H.T.; Moe, C. Genetic susceptibility to norovirus GII.3 and GII.4 infections in Chinese pediatric diarrheal disease. *Pediatrics Infect. Dis.* **2014**, *33*, 305–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lopman, B.A.; Trivedi, T.; Vicuña, Y.; Costantini, V.; Collins, N.; Gregoricus, N.; Parashar, U.; Sandoval, C.; Broncano, N.; Vaca, M. Norovirus infection and disease in an ecuadorian birth cohort: Association of certain norovirus genotypes with host FUT2 secretor status. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 1813–1821. [[CrossRef](#)]
58. Bucardo, F.; Kindberg, E.; Paniagua, M.; Grahn, A.; Larson, G.; Vildevall, M.; Svensson, L. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 728–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. de Rougemont, A.; Ruvoen-Clouet, N.; Simon, B.; Estienney, M.; Elie-Caille, C.; Aho, S.; Pothier, P.; Le Pendu, J.; Boireau, W.; Belliot, G. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* **2011**, *85*, 4057–4070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lindesmith, L.; Moe, C.; Le Pendu, J.; Frelinger, J.A.; Treanor, J.; Baric, R.S. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J. Virol.* **2005**, *79*, 2900–2909. [[CrossRef](#)]
61. Jin, M.; He, Y.; Li, H.; Huang, P.; Zhong, W.; Yang, H.; Zhang, H.; Tan, M.; Duan, Z.J. Two gastroenteritis outbreaks caused by GII noroviruses: Host susceptibility and HBGA phenotypes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58605. [[CrossRef](#)]
62. Barbé, L.; Le Moullac-Vaidye, B.; Echasserieau, K.; Bernardeau, K.; Carton, T.; Bovin, N.; Nordgren, J.; Svensson, L.; Ruvoën-Clouet, N.; Le Pendu, J. Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14. [[CrossRef](#)]
63. Gozalbo-Rovira, R.; Ciges-Tomas, J.R.; Vila-Vicent, S.; Buesa, J.; Santiso-Bellón, C.; Monedero, V.; Yebra, M.J.; Marina, A.; Rodríguez-Díaz, J. Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007856. [[CrossRef](#)]
64. Sun, X.; Dang, L.; Li, D.; Qi, J.; Wang, M.; Chai, W.; Zhang, Q.; Wang, H.; Bai, R.; Tan, M.; et al. Structural basis of glycan recognition in globally predominant human P[8] rotavirus. *Virol. Sin.* **2019**, *35*, 156–170. [[CrossRef](#)]
65. Xu, S.; Ahmed, L.U.; Stuckert, M.R.; McGinnis, K.R.; Liu, Y.; Tan, M.; Huang, P.; Zhong, W.; Zhao, D.; Jiang, X.; et al. Molecular basis of P[III] major human rotavirus VP8* domain recognition of histo-blood group antigens. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Larsson, M.M.; Rydell, G.E.; Grahn, A.; Rodriguez-Diaz, J.; Akerlind, B.; Hutson, A.M.; Estes, M.K.; Larson, G.; Svensson, L. Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J. Infect. Dis.* **2006**, *194*, 1422–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tu, L.T.; Liu, F.P.; Huang, Y.C.; Huang, C.G.; Yang, S.; Tsao, K.C.; Lai, M.W.; Chen, C.J. Genetic susceptibility to norovirus GII.4 sydney strain infections in Taiwanese children. *Pediatrics Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 353–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kubota, T.; Kumagai, A.; Ito, H.; Furukawa, S.; Someya, Y.; Takeda, N.; Ishii, K.; Wakita, T.; Narimatsu, H.; Shirato, H. Structural basis for the recognition of lewis antigens by genogroup I norovirus. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11138–11150. [[CrossRef](#)]
69. Serpa, J.; Almeida, R.; Oliveira, C.; Silva, F.S.; Silva, E.; Reis, C.; Le Pendu, J.; Oliveira, G.; Ribeiro, L.M.; David, L. Lewis enzyme (alpha1-3/4 fucosyltransferase) polymorphisms do not explain the lewis phenotype in the gastric mucosa of a Portuguese population. *J. Hum. Genet.* **2003**, *48*, 183–189. [[CrossRef](#)]
70. Torrado, J.; Ruiz, B.; Garay, J.; Cosme, A.; Arenas, J.I.; Bravo, J.C.; Fontham, E.; Correa, P. Lewis, secretor, and ABO phenotypes, and sulfomucin expression in gastric intestinal metaplasia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **1997**, *6*, 287–289.
71. Corvelo, T.C.; de Loiola, R.; Aguiar, D.C.; de Matos, G.; de Brito, D.C. The Lewis histo-blood group system: Molecular analysis of the 59T>G, 508G>A, and 1067T>A polymorphisms in an Amazonian population. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69908. [[CrossRef](#)]

72. Nishihara, S.; Narimatsu, H.; Iwasaki, H.; Yazawa, S.; Akamatsu, S.; Ando, T.; Seno, T.; Narimatsu, I. Molecular genetic analysis of the human lewis histo-blood group system. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29271–29278.
73. Soejima, M.; Kimura, H.; Koda, Y. Two novel FUT3 alleles responsible for lewis-null phenotypes in Sri Lanka. *Transfusion* **2004**, *44*, 1534–1535. [[CrossRef](#)]
74. Soejima, M.; Munkhtulga, L.; Iwamoto, S.; Koda, Y. Genetic variation of FUT3 in ghanaians, caucasians, and mongolians. *Transfusion* **2009**, *49*, 959–966. [[CrossRef](#)]



© 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/>).

RESEARCH ARTICLE

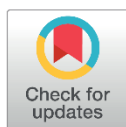

Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016

Débora Maria Pires Gonçalves Barreira¹*, Túlio Machado Fumian²*, Marco André Loureiro Tonini¹, Lays Paula Bondi Volpini¹, Rodrigo Pratte Santos¹, Anézia Lima Chaves Ribeiro³, José Paulo Gagliardi Leite², Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza², Patrícia Brasil⁴, Denise Cotrim da Cunha⁵, Marize Pereira Miagostovich², Liliana Cruz Spano¹

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

* These authors contributed equally to this work.

* deborambarreira@yahoo.com.br


 OPEN ACCESS

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

Editor: Pierre Roques, CEA, FRANCE

Received: August 22, 2017

Accepted: November 28, 2017

Published: December 13, 2017

Copyright: © 2017 Barreira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

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

Abstract

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

Espírito Santo Research Foundation (FAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Noroviruses, belonging to the genus *Norovirus* in the *Caliciviridae* family, are a leading cause of acute gastroenteritis (AGE) in all age groups worldwide [1]. Annually, it is estimated that noroviruses account for more than 200,000 deaths globally, with significant disease burdens in developing countries [2]. Noroviruses can be subdivided into seven genogroups (G), of which GI, GII and GIV have been detected in humans, and they can be further divided into 33 genotypes [3]. The norovirus-positive single-stranded RNA genome is organized into three open reading frames (ORFs 1, 2 and 3): ORF1 encodes non-structural proteins, ORF2 encodes the major structural protein (VP1), and ORF3 encodes the minor structural protein (VP2) [4]. The VP1 protein is organized into the N-terminal (N), the shell (S), and the protruding (P) domains, and the last domain can be further divided into two subdomains, P1 and P2. The P2 subdomain is exposed on the surface of the capsid protein and contains the major antibody recognition epitopes (A-E) and the histo-blood group antigen (HBGA) binding domains [5, 6].

These viruses are genetically diverse, with genetic drift and recombination being the main driving forces shaping their evolution [7]. It is well known that the norovirus recombination hotspot is located near the ORF1/ORF2 overlapping region, and a variety of recombinant strains have been reported in Brazil and elsewhere [8, 9, 10, 11]. Despite its high genetic diversity, most AGE outbreaks are caused by a single norovirus genotype: GII.4 [1, 12]. Since 1995, several different variants of GII.4 have emerged, remaining in human populations for 3 to 8 years, and they are associated with the global increase in AGE outbreaks [13]. The current pandemic variant (GII.4 Sydney), first detected in Australia in 2012, originated from an antigenic capsid variation and recombination event (GII.Pe-GII.4), and it rapidly spread globally [14].

A novel norovirus recombinant strain, GII.P16-GII.4, emerged in 2015 in the USA, and it has been the predominant outbreak strain since then [15]. In September 2016, this strain was described as the cause of an AGE outbreak in patients in Kawasaki City, Japan [16]. Since then, GII.P16-GII.4 has been reported in sporadic cases and outbreaks from September to December 2016 in Germany and in increased outbreaks during 2016/2017 in France, and it was detected in the waters of coastal streams in South Korea in December 2015, replacing the formerly dominant strain GII.P17-GII.17 [17, 18]. The last report came from sporadic cases and outbreaks during 2015–2016 in England [19]. Our study documents for the first time the emergence of this strain in samples from children with AGE on the southeastern coast of Brazil.

Materials and methods

Specimens and ethics statement

Faecal specimens were collected from 190 children up to 11 years old during a surveillance study of sporadic cases of AGE conducted between January 2015 and July 2016 in the southeastern Brazilian coast state, Espírito Santo. Inpatients and outpatients were enrolled at a paediatric hospital and a public health facility located in the city of Vitória (state capital) to assess norovirus and rotavirus A frequencies. Three additional norovirus-positive specimens were included in the study. They were obtained from an ongoing community-based project that aims to monitor the incidence of norovirus and rotavirus A from asymptomatic and symptomatic children living in Manguinhos, a shantytown in northern Rio de Janeiro state, also on the southeastern Brazilian coast. All specimens were obtained after parents signed the consent form. The studies were approved by either the Institutional Ethical Research Committee of the Center of Health Sciences of the Federal University of Espírito Santo (No. 704.923/14) or the Oswaldo Cruz Foundation–CEP/ENSP/Fiocruz n° 688.566/14).

RNA extraction and norovirus detection

Viral RNA was extracted from 10% faecal suspensions (w/v), and the nucleic acids were extracted using the commercial QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Initially, norovirus detection was performed by RT-qPCR using primers and a probe targeting the ORF1/2 junction [10, 20].

Molecular characterization, phylogenetic and recombination analysis

For norovirus characterization, positive samples were amplified by using the One-Step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) with Mon431 (nt 4820–4839) and G2SKR (nt 5367–5389) primers targeting a 570 bp fragment covering the 3'-end ORF1 and 5'-end ORF2, named regions B and C, respectively [21, 22]. Sequencing was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the genotype was assigned using the Norovirus Automated Genotyping Tool [23]. Phylogenetic trees (based on the partial sequences of ORFs1 and 2) were constructed using the neighbour-joining method (Kimura two-parameter model, 2000 bootstrap replications for branch support) in MEGA 6.0 [24].

Plot similarity was carried out using SimPlot version 3.5.1 [25] to confirm the recombination event and to identify a putative recombination breakpoint. SimPlot analysis was performed by setting the window width and the step size to 200 bp and 20 bp, respectively. In addition, different methods implemented in the Recombination Detection Programme v.4.16 (RDP4) were also used [26], such as Bootscan, Recscan, GENECONV, Maxchi, and Chimaera analysis. One of the recombinant strains obtained in our study (LVCA_25726) was included as a query, while putative parental sequences were obtained from the GenBank database. Events detected by RDP with a p-value less than 10^{-5} were considered significant. The 40 sequences of the ORF1/2 region were deposited in GenBank under the accession numbers KY451971-KY451987 and MF158177-MF158199.

P2 region analysis

The P2 subdomains of three samples were amplified using the primers EVP2F and EVP2R [27] to explore nucleotide and amino acid changes in the major epitopes of the VP1 protein. The four P2 sequences were deposited in GenBank under the accession numbers MF681695-MF681696 and KY551568-KY551569.

Results

A total of 26.8% (51/190) of the samples were positive for the GII norovirus, all in children up to four years old, and no GI genotypes were detected; 37 strains from among the 51 noroviruses were successfully sequenced. Based on results obtained with the genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) and from both the polymerase and capsid phylogenetic trees, most (59.5%) of the strains characterized (22/37) were classified as the novel norovirus recombinant form GII.P16-GII.4 Sydney (Table 1, Fig 1), including the three strains from Rio de Janeiro, followed by GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 (24.3%). The two strains were not co-circulating, and since the first detection of the newly emergent GII.P16-GII.4, it has predominated among the strains characterized (Table 1).

All the samples characterized as the new recombinant strain containing the GII.P16 polymerase genotype were detected between February and June 2016, and they represented 84.6% (22/26) of all genotyped samples in that period. Three samples were characterized as GII.P17-GII.17, a formerly emergent genotype, in the months of January to May 2016.

Table 1. Distribution of norovirus genotypes detected in samples collected between January 2015 and July 2016 (n = 37) of the southeastern Brazilian coast state, Espírito Santo.

YEAR	Norovirus sequenced region ORF-1 ORF-2		Number of strains (%) N = 37
2015	GII.P16	GII.3	1 (2.7)
	GII.Pg	GII.1	1 (2.7)
	GII.Pe	GII.4 Sydney 2012	9 (24.3)
2016	GII.PNA	GII.4	1 (2.7)
	GII.P17	GII.17	3 (8.1)
	GII.P16	GII.4 Sydney	22 (59.5)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189504.t001>

The 22 GII.P16 sequences detected in our study belong to the recent emergent recombinant form grouped into a separate clade containing GII.P16-GII.4 Sydney strains that were recently detected in the USA (KX907727) and Japan (LC175468) in the years 2015 and 2016, respectively (Fig 1A). The other detected RdRp sequence of GII.P16 present in a different recombinant type (GII.3 capsid genotype) was grouped into another phylogenetic clade along with strains detected before 2014, represented by recombinant forms with different capsid genotypes, such as GII.13 and GII.3 (Fig 1B).

SimPlot analysis confirmed the recombination event between GII.P16 and GII.4 Sydney and revealed the breakpoint location near the ORF1-2 junction for all strains (data not shown), like the strains described in Japan [15]. When comparing four strains with the reference strain Sydney 2012 (JX459907), other than an exchange of an amino acid (aa) at position 315 (all strains) and at positions 309 and 414 (NR11), which are outside the main antigenic sites (epitopes A-E), we observed no other aa changes (Fig 2).

Discussion

In Brazil, a great diversity of norovirus GII.4 variants, as well as intra-genotype recombinant strains, have circulated throughout the country, following the global pattern observed in many studies [28, 29, 30]. Herein, we described the detection in Brazil of an emergent recombinant genotype that is currently circulating in many countries worldwide [15, 16, 17, 18, 19]. During the study period, we observed a change in the circulation pattern of the recombinant strains, with GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 predominant in 2015, followed by an emergence and predominance of GII.P16-GII.4 Sydney in 2016.

The emergence and predominance of the novel recombinant GII.P16-GII.4 Sydney in 2016 in southeastern Brazil corroborates with a similar trend in the current genotype circulation observed in other countries, such as the USA, Japan, France, England and South Korea [15, 16, 17, 19, 31]. In the USA, GII.P16-GII.4 Sydney predominated in the winter of 2015–2016 and became responsible for 60% of the total norovirus AGE outbreaks during the winter of 2016–2017 (<https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/caliciNet/data-tables.html>) [15].

During this study, we also detected the formerly emergent GII.P17-GII.17 in three samples analysed from 2016. This emergent virus had already been detected in Brazil in 2015 [32, 33]; however, despite a global distribution, its major impact in causing AGE outbreaks was observed mainly in Asian countries [34, 35, 36, 37].

It is noteworthy that despite GII.4 being the most prevalent genotype worldwide, limited types of polymerase recombination are described, such as GII.P1, GII.P12, GII.Pe and GII.P21 [9, 38, 39], suggesting that there is a restriction mediated by the efficiency of viral replication [38]. In turn, the GII.P16 polymerase, albeit less common, has already been detected as being associated with the GII.3 capsid genotype in Spain, Bangladesh and Italy [40, 41, 42], with GII.2 in China and Japan [43, 44], GII.13 in Italy and Nepal [42, 45] and GII.17 in South Africa

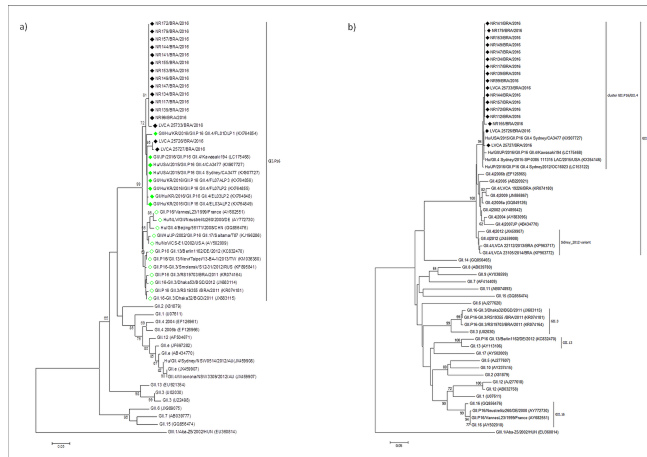


Fig 1. Phylogenetic analysis of GII norovirus based on the partial nucleotide sequences of the polymerase and capsid regions, using the MON431 (nt 4820–4839) and G2SKR (nt 5367–5389) primers. (a) Phylogenetic tree of 231 bp within the polymerase region (3'-ORF1). (b) Phylogenetic tree of 277 bp within the capsid region (5'-ORF2). References strains of norovirus genotypes are named according to GenBank with their respectively accession numbers. Brazilian strains are marked with black filled diamonds. Recombinant strains of GII.P16-GII.4 are marked with green filled diamonds, and recombinant strains of GII.P16 grouping with non-GII.4 capsid genotypes are highlighted with unfilled green diamonds. The bootstrap values (2,000 replicates) are indicated in the phylogenetic tree, and values less than 70% are not represented. The bar at the bottom of the figure is proportional to the genetic distance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189504.g001>

[46]. In our study, GII.P16 was detected with the GII.3 capsid genotype circulating in 2015; however, it was grouped in a different cluster than our GII.P16-GII.4 Sydney strains and previous strains detected in AGE outbreaks in Southern Brazil between 2010 and 2011 [10]. Recently, GII.P16 re-emerged combined with GII.2 grouped in the same cluster as the polymerase GII.P16 of the new recombinant GII.P16-GII.4 Sydney, differing from the previous one and suggesting the importance of the current GII.P16 polymerase in norovirus circulation worldwide [18, 19, 47, 48, 49, 50, 51, 52]. The authors also described the importance of the polymerase for viral fitness and variability [19]; therefore, the newly acquired polymerase could play a role in the success of this recombinant form.

Although aa changes in major epitopes are important to norovirus evolution, especially epitopes A and D, which played a role in the emergence of the last variant GII.4 Sydney 2012 [53], the three strains analysed in our study showed no aa changes in any of these sites compared with the GII.4 Sydney 2012 reference strain (JX459907), or with GII.P16-GII.4 strains detected in Japan and the USA (Fig 2). Similar results were obtained by Ruis et al. (2017), who reported no amino acid substitutions in the capsid of GII.P16 strains isolated in England between 2015

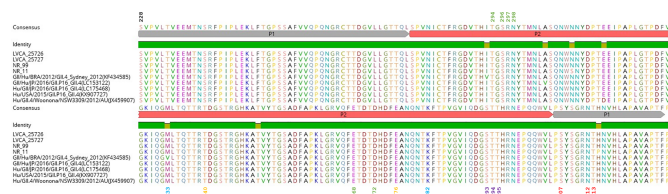


Fig 2. Alignment of sequences of VP1 protruding P domain derived from norovirus GII.4 strains. Antigenic epitopes A (green), B (blue), C (orange), D (purple) and E (red) are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189504.g002>

and 2016, indicating the inability of this new recombinant strain to escape immunity against the old GII.Pe-GII.4 Sydney 2012.

In conclusion, we described the newly emergent GII.P16-GII.4 Sydney strain circulating along the southeastern coast of Brazil and becoming the predominant strain among samples from this region analysed in 2016, having replaced the formerly emergent genotype GII.Pe-GII.4 Sydney. The epidemiological impact of this emergent recombinant strain is still unknown; however, it has already been detected circulating in several countries, suggesting a potential worldwide distribution.

The genetic novelty of the new recombinant strains could reside in the acquisition of a more efficient polymerase [19, 52]. The sequencing of both polymerase and capsid genes is a valuable tool for a proper understanding of norovirus epidemiology and evolution. Concerning this new variant, future studies are needed to investigate how long this recombinant will remain circulating and whether new forms of GII.P16 recombination will emerge.

Acknowledgments

We would like to thank the Health Surveillance Management and the Monitoring Service in Diarrheal Diseases of Espírito Santo state, the Technical School of Health of the municipality of Vitória, and Dr. Alba Lilia Rosetti de Almeida (Epidemiological Surveillance Service of the Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória), Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj). This study was supported by Espírito Santo Research Foundation (FAPES)/National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Department of Science and Technology (Decit)—Secretary of Science Technology and Strategic Inputs (SCTIE)—Health Ministry (MS)/Health's Secretary (SESA) (no.10/2013-PPSUS), and PROEP/CNPQ (no. 402135/2011-3).

Author Contributions

Conceptualization: José Paulo Gagliardi Leite, Liliana Cruz Spano.

Funding acquisition: Liliana Cruz Spano.

Investigation: Débora Maria Pires Gonçalves Barreira, Túlio Machado Fumian, Marco André Loureiro Tonini, Lays Paula Bondi Volpini, Rodrigo Pratte Santos, Anézia Lima Chaves Ribeiro, Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, Patrícia Brasil, Denise Cotrim da Cunha.

Project administration: Liliana Cruz Spano.

Resources: Túlio Machado Fumian, José Paulo Gagliardi Leite, Marize Pereira Miagostovich, Liliana Cruz Spano.

Supervision: Liliana Cruz Spano.

Visualization: Débora Maria Pires Gonçalves Barreira, Túlio Machado Fumian.

Writing – original draft: Débora Maria Pires Gonçalves Barreira, Túlio Machado Fumian.

Writing – review & editing: Túlio Machado Fumian, José Paulo Gagliardi Leite, Liliana Cruz Spano.

References

1. Green KY. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. *Fields Virology*, 6th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2013. p. 508–609.

2. Patel MM, Widdowson M, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(8): 1224–31. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114> PMID: 18680645
3. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(2): 373–81. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14> PMID: 24989606
4. Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol*. 2014; 95(2): 278–91.
5. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(3): 231–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2296> PMID: 20125087
6. Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, Vinjé J, et al. Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes. *J Virol*. 2013; 87(5): 2803–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.03106-12> PMID: 23269783
7. White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(8): 741–5. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12746> PMID: 24980204
8. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus Recombination in ORF 1/2 overlap. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(7):1079–85. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041273> PMID: 16022784
9. Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol*. 2013; 87(11): 6270–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.03464-12> PMID: 23536665
10. Fumian TM, de Andrade JSR, Leite JPG, Miagostovich MP. Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil 2004–2011. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0145391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145391> PMID: 27116353
11. Hernandez JM, da Silva LD, Junior ECS, de Lucena MSS, Soares LS, Mascarenhas JD, et al. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol*. 2016; 39: 365–71. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.007> PMID: 26861619
12. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*. 2008; 5(2): e31. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050031> PMID: 18271619
13. Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, Johnson JA, Lepore C, Sosnovtsev SV, et al. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog*. 2017; 13(1): e1006136. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006136> PMID: 28103318
14. Van Beek J, Van Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden J S, Fonager J, Hewitt J, et al. Indication for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*. 2013; 18 (1): 8–9. PMID: 23305715
15. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswo ME, Castro CJ, Magaña LC, et al. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the US Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses, 2013–2016. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55(7): 2208–2221.
16. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, et al. Complete genome sequence of a recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus detected in Kawasaki city, Japan, in 2016. *Genome Announc*. 2016; 4(5): 5–6.
17. Choi YS, Koo ES, Kim MS, Choi JD, Shin Y, Jeong YS. Re-emergence of a GII. 4 Norovirus Sydney 2012 variant equipped with GII. P16 RdRp and its predominance over novel variants of GII.17 in South Korea in 2016. *Food Environ Virol*. 2017; 9(2): 168–178. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9278-4> PMID: 28120262
18. Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hübinger AM, Hofmann J, Zimmermann O, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill*. 2017; 26: 22(4): pii 30447.
19. Ruis C, Roy S, Brown JR, Allen DJ, Goldstein RA, 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(6): e0179572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179572> PMID: 28662035
20. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4): 1548–57. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003> PMID: 12682144

21. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002; 100(1–2): 107–14. PMID: [11742657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742657/)
22. Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(4):1925–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1925-1931.2002> PMID: [11916714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11916714/)
23. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011; 51(2): 121–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006> PMID: [21514213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514213/)
24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12): 2725–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
25. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*. 1999; 73: 152–160. PMID: [9847317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9847317/)
26. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*. 2015; 26; 1(1):vev003.
27. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, Vinjé J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17(8), 1389–95. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101837> PMID: [21801614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21801614/)
28. Silva LD, Rodrigues EL, Lucena MS, Lima IC, Oliveira DS, Soares LS, et al. Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108(8): 1068–70. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130293> PMID: [24141954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24141954/)
29. Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JPG, Miagostovich MP. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One*. 2014; 9(3): 1–7.
30. Siqueira JAM, Bandeira RS, Justino MCA, Linhares AC, Gabbay YB. Characterization of novel intra-genotype recombination events among norovirus pandemic GII.4 variants. *Infect Genet Evol*. 2016; 44: 361–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.037> PMID: [27476607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27476607/)
31. Bidalot M, Théry L, Kaplon J, De Rougemont A, Ambert-Balay K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill*. 2017; 22(15): pii 30508.
32. Andrade JSR, Fumian TM, Leite JPG, Assis MR, Bello G, Mir D. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. *Infect Genet Evol*. 2017; 51: 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.011> PMID: [28300648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28300648/)
33. Silva LD, Bandeira RD, Junior EC, Lima IC, da Penha Júnior ET, Teixeira DM. Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infect Genet Evol*. 2017; 48:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.027> PMID: [27923768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27923768/)
34. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, et al. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill*. 2015; 20(26): pii 21173.
35. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 2015; 20: pii 21178.
36. Dang Thanh H, Than VT, Nguyen TH, Lim I, Kim W. Emergence of Norovirus GII.17 Variants among Children with Acute Gastroenteritis in South Korea. *PLoS One*. 2016; 5: 11(5): e0154284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154284> PMID: [27148739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27148739/)
37. Chan MCW, Hu Y, Chen H, Podkolzin AT, Zaytseva EV, Komano J, et al. Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 1359–1354. <https://doi.org/10.3201/eid2308.161138> PMID: [28726618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28726618/)
38. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *The Journal of General Virology*. 2007; 88: 3347–59. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83321-0> PMID: [18024905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024905/)
39. Mori K, Chu P, Motomura K, Somura Y, Nagano M, Kimoto K, et al. Genomic analysis of the evolutionary lineage of Norovirus GII.4 from archival specimens during 1975–1987 in Tokyo. *J Med Virol*. 2016; 89(2): 363–367. <https://doi.org/10.1002/jmv.24624> PMID: [27380721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27380721/)
40. Nahar S, Afrad MH, Matthijnssens J, Rahman MZ, Momtaz Z, Yasmin R, et al. Novel intergenotype human norovirus recombinant GII.16/GII.3 in Bangladesh. *Infect Genet Evol*. 2013; 20: 325–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.021> PMID: [24080167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24080167/)

41. Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012. *PLoS One*. 2014; 9(6):2009–12.
42. Medici MC, Tummolo F, Martella V, Giammanco GM, De Grazia S, Arcangeletti MC, et al. Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. *Virus Res*. 2014; 188: 142–5. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.005> PMID: 24751799
43. Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, et al. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol*. 2012; 84: 517–25. <https://doi.org/10.1002/jmv.23211> PMID: 22246841
44. Wang YH, Zhou DJ, Zhou X, Yang T, Ghosh S, Pang BB, et al. Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007–2010. *Arch Virol*. 2012; 157, 2417–24. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1437-1> PMID: 22886184
45. Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Sano D, Sherchand JB, Pandey BD, Cunliffe NA, et al. Molecular epidemiology of noroviruses detected in Nepalese children with acute diarrhea between 2005 and 2011: increase and predominance of minor genotype GII.13. *Infect Genet Evol*. 2015; 30: 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.003> PMID: 25497351
46. Mans J, Murray TY, Taylor MB. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. *Virol J*. 2014; 11: 168. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-168> PMID: 25228444
47. Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X, et al. Norovirus GII.P16/GII.2-Associated Gastroenteritis, China, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(7): 1172–1175. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170034> PMID: 28430563
48. Lu J, Fang L, Sun L, Zeng H, Li Y, Zheng H, et al. Association of GII.P16-GII.2 Recombinant Norovirus Strain with Increased Norovirus Outbreaks, Guangdong, China, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(7): 1188–1190. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170333> PMID: 28430561
49. Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, et al. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol*. 2017; 8: 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00705> PMID: 28487679
50. Liu LT, Kuo TY, Wu CY, Liao WT, Hall AJ, Wu FT. Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus, Taiwan, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(7):1180–1183. <https://doi.org/10.3201/eid2307.170212> PMID: 28585917
51. Chan MCW, Kwok K, Hung TN, Chan LY, Chan PKS. Complete Genome Sequence of an Emergent Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus Strain Associated with an Epidemic Spread in the Winter of 2016-2017 in Hong Kong, China. *Genome Announc*. 2017; 5(20): pii e00343-17.
52. Tohma K, Lepore CJ, Ford-Siltz LA, Parra GI. Phylogenetic Analyses Suggest that Factors Other Than the Capsid Protein Play a Role in the Epidemic Potential of GII.2 Norovirus. *mSphere*. 2017; 2(3): pii e00187-17.
53. Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Costantini V, Beltramello M, Corti D, et al. Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity. *J Infect Dis*. 2013; 208(11): 1877–87. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit370> PMID: 23908476