



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DIARREIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM ETIOLOGIA VIRAL E ANTÍGENOS DO GRUPO HISTO-SANGUÍNEO EM CRIANÇAS ≤ 5 ANOS ATENDIDAS NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE SANTO ANTÔNIO EM BOA VISTA, RORAIMA, 2016-2017.

ALBERTO IGNACIO OLIVARES OLIVARES

Rio de Janeiro

Setembro de 2020

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

ALBERTO IGNACIO OLIVARES OLIVARES

Estudo epidemiológico da diarreia aguda, correlação com etiologia viral e antígenos do grupo histo-sanguíneo em crianças ≤ 5 anos atendidas no Hospital da Criança de Santo Antônio em Boa Vista, Roraima, 2016-2017.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências área de concentração: Ecologia e Epidemiologia.

Orientador Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2020

OLIVARES OLIVARES, ALBERTO IGNACIO.

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DIARREIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM ETIOLOGIA VIRAL E ANTÍGENOS DO GRUPO HISTO-SANGUÍNEO EM CRIANÇAS \leq 5 ANOS ATENDIDAS NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE SANTO ANTÔNIO EM BOA VISTA, RORAIMA, 2016-2017. / ALBERTO IGNACIO OLIVARES OLIVARES. - Rio de janeiro, 2020.

XIX, 157f f.; il.

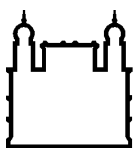
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: JOSE PAULO GAGLIARDI LEITE.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Rotavírus A, norovírus, sapovírus, astrovírus. 2. Adenovírus humano, bocavírus humano. 3. Crianças da Amazônia menores ou igual a 5 anos. 4. Doença diarreica aguda e infecção respiratória aguda. 5. Antígenos do grupo histo-sanguíneos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

AUTOR: ALBERTO IGNACIO OLIVARES OLIVARES

Estudo epidemiológico da diarreia aguda, correlação com etiologia viral e antígenos do grupo histo-sanguíneo em crianças ≤ 5 anos atendidas no Hospital da Criança de Santo Antônio em Boa Vista, Roraima, 2016-2017.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 18/ 09 / 2020

EXAMINADORES:

Membros Titulares:

Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa (Presidente e Revisor) – IOC

Prof. Dra. Patrícia Brasil – INI / FIOCRUZ (Membro)

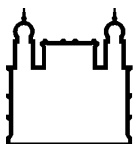
Prof. Dra. Joana D’Arc Pereira Mascarenhas - Membro externo (IEC / PA-Belém)

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Márcio Neves Bóia – IOC / FIOCRUZ (Suplente)

Prof. Dra. Carmen Baur Vieira – UFF / RJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 18 de Setembro de 2020.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de Alberto Ignacio Olivares Olivares, sob orientação do Dr. José Paulo Gagliardi Leite. Ao décimo oitavo dia do mês de setembro de dois mil e vinte, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: **“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DIARREIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM ETIOLOGIA VIRAL E ANTÍGENOS DO GRUPO HISTO-SANGUÍNEO EM CRIANÇAS ≤ 5 ANOS ATENDIDAS NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE SANTO ANTÔNIO EM BOA VISTA, RORAIMA, 2016-2017”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Patricia Brasil – INI/FIOCRUZ, Dr^a. Joana D’Arc Pereira Mascarenhas – IEC/PA e como suplentes: Dr. Márcio Neves Bóia - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Carmen Baur Vieira - UFF/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 18 de setembro de 2020.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca)

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

DEDICATÓRIA

Ao ser supremo que nos deu o sopro da vida.

Aos meus pais, Teodorico e Fortunata, pelo seu amor e fonte constante de superação, possuidores de sabedoria dos quais herdei os valores necessários para minha formação de cidadão e profissional.

À minha esposa, Livoni, pela compreensão durante a ausência provocada por esta tese.

E, sobretudo, por esse amor que permeia, preenche e justifica cada segundo das nossas vidas.

Aos nossos filhos, Ana Beatriz, Alice Vitoria, Alberto Filho, fontes inesgotáveis de inspiração.

Aos que demonstraram desprendimento, dedicação e disponibilizaram alguns momentos de suas vidas contribuindo com informações necessárias para que esta pesquisa fosse realizada de início ao fim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador o Professor Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela amizade, exemplo, paciência, contribuição constante nesta pesquisa e suas importantes observações de sempre, além do suporte na cidade do Rio de Janeiro.

A minha Co-orientadora Professora Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, pelos ensinamentos, parceria, amizade, exemplo, paciência, compreensão e suporte na cidade do Rio de Janeiro.

A Professora Dra. Marize Pereira Miagostovich, Chefe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz do Rio de Janeiro, pelo apoio do laboratório e insumos tão necessários para a realização desta pesquisa, nosso muitíssimo obrigado.

A todos os que realizam suas atividades na Casa Amarela da FIOCRUZ-RJ, no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, pelo apoio, receptividade e carinho todas as vezes que estive aí, fazendo-me sentir em casa.

A Pós-graduação em Biologia Parasitária, do Instituto Oswaldo Cruz- IOC/FIOCRUZ, coordenação e todos do apoio administrativo, pela possibilidade de realização deste estudo apresentado como tese.

Ao Prof. Dr. Romanul de Souza Bispo da UFRR, pelo suporte estatístico deste estudo, de anteriores e futuros, além da amizade e seu valioso tempo disponibilizado aos Sábados e Domingos para conosco.

Ao Prof. Dr. José Francisco Luitgards-Moura Diretor do Núcleo OBSERVARR da UFRR, pelo incansável estímulo para início e conclusão desta pesquisa, nossa sincera gratidão e amizade de sempre.

A Prof. Dra. Maria Goreti Rosa Freitas, fundadora da NAVE (Núcleo Avançado de Vetores) - FIOCRUZ-RR que originou o ObservARR, pelo caminho aberto para os estudos da graduação e pós-graduação no curso de Medicina da Universidade Federal de Roraima, carinho, amizade e apoio constante.

Ao Diretor do Departamento de Política e Apoio ao Diagnóstico Especializado, DPADE/CGAE/SESAU, Sr. George Ribeiro de Oliveira, pelo apoio com os insumos para realizar o tipo sanguíneo e fator Rh no laboratório do Hospital da Criança Santo Antônio.

Ao Senhor Sebastião Salazar, bioquímico integrante do grupo dos ensaios Laboratoriais do Hospital Maternidade Nossa Senhora de Nazaré.

Aos membros da banca pela disponibilidade de revisar esta tese e dar sugestões para seu aperfeiçoamento.

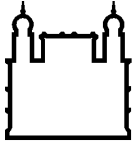
Aos nossos pequenos pacientes e seus pais por tornarem possível este estudo no Hospital da Criança de Santo Antônio de Boa Vista-RR, também aos trabalhadores da saúde de todos os setores do Hospital, auxiliares, técnicos de enfermagem, enfermeiras, bioquímicos, biomédicos, médicos da emergência, dos blocos, a diretora, colegas plantonistas dos finais de semana. Ao Hospital Coronel Mota na pessoa do colega e amigo o Dr. Ciro Hernandez Collazo, pela flexibilidade e amizade de sempre, ao Centro Cardiológico de Diagnóstico por Imagens, representada pela Diretora Dona Maria de Fatima de Jesus Silva, Vânia Magaly Amador Dos Reis (atual Diretora do CCDI), Secretaria Municipal e Estadual de Saúde, Coordenação da Biblioteca da Universidade Federal de Roraima, Prefeita de Boa Vista e Governador do Estado de Roraima.

Ao Todo poderoso, pela preciosa dádiva de nos permitir o dom de compartilhar e dar sentidos aos diversos conhecimentos da natureza humana.

A todos aqueles que amam e lutam pela vida, e por mais que enfrentam os piores obstáculos encontram sempre meios e estratégias para avançar e vencer com dignidade, mediante muita fé e esperança.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso, aprendemos sempre”.

(Paulo Freire, 1970).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

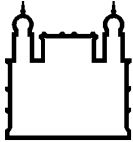
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo epidemiológico da diarreia aguda, correlação com etiologia viral e antígenos do grupo histo-sanguíneo em crianças ≤ 5 anos atendidas no Hospital da Criança de Santo Antônio em Boa Vista, Roraima, 2016-2017.

RESUMO

Neste estudo avaliamos o impacto das doenças diarreicas agudas (DDA) associadas aos rotavírus A (RVA), norovírus, adenovírus (HAdV), sapovírus (SaV), bocavírus (HBoV) e astrovírus (HAstV) em crianças ≤ 5 anos atendidas na emergência do Hospital da Criança de Santo Antônio (HCSA), Boa Vista, Roraima (RR), no período de outubro de 2016 a outubro de 2017. Foram coletadas, paralelamente, amostras de fezes e de saliva de 734 crianças sendo 485 com DDA e 249 com infecção respiratória aguda (IRA, grupo controle). O estudo teve a aprovação do CEP:1.333.480, 23/11/2015, UFRR. Os RVA, norovírus, HAdV, SaV e HBoV foram pesquisados nas 734 amostras de fezes e HAstV em 170 amostras de crianças com DDA. Adicionalmente, a presença dos HBoV foi também investigada em 38 amostras de saliva sendo 25 de crianças com DDA e 13 IRA. O perfil de susceptibilidade AB0, Lewis e secretor dos antígenos do grupo histossanguíneo (HBGA) foi determinado para todas as 734 crianças em salivas pela fenotipagem e em amostras de salivas pela genotipagem, sendo para o gene *FUT2* em 166 amostras e para *FUT3* em 42 amostras. Os aspectos clínicos, epidemiológicos e a cobertura da vacina Rotarix[®] (RV1) foram também avaliados. Os RVA, norovírus e SaV foram investigados pela metodologia de transcrição reversa seguida de amplificação genômica quantitativa (RT-qPCR); os HBoV e HAdV pela amplificação genômica quantitativa (qPCR) e os HAstV por amplificação genômica qualitativa (RT-PCR). A genotipagem dos HBoV e a detecção/genotipagem dos HAstV foi realizada pela PCR seguida de sequenciamento nucleotídico (método Sanger). O Ensaio imunoenzimático (EIA) e a amplificação genômica específica (PCR-*touchdown*), seguida de sequenciamento nucleotídico (Sanger) foram utilizadas respectivamente para a fenotipagem e genotipagem dos HBGA. Nas crianças com DDA (n=485), observou-se as seguintes frequências virais: RVA (22,7%), norovírus (38%), HAdV (33,6%), SaV (7,3%) e HBoV (14,2%). Nas crianças com IRA (n=249), observou as seguintes frequências: RVA (19,3%), norovírus (21,3%), HAdV (39,5%), SaV (5,6%) e HBoV (14,1%). O perfil de detecção do HBoV nas 76 amostras de saliva e fezes pareadas foi diferente e correlacionado com os genótipos 1 a 3 detectados. Quanto aos HAstV, nas 170 amostras investigadas, observou-se as seguintes frequências e genótipos: HAstV clássicos: HAstV3 (0,60%) e HAstV5 (1,8%); HAstV não clássicos: HAstVMLB1-2 (3,5%), sendo esta a primeira descrição do HAstVMLB2 no Brasil. A cobertura vacinal para RV1 calculada foi de 61% e crianças vacinadas na faixa etária entre 6 e 24 meses apresentaram frequências mais elevadas de infecção pelo RVA. As 734 crianças apresentaram majoritariamente (54,5%) o perfil Lea+b+ (fraco secretor) e polimorfismos de nucleotídico único (*SNPs*) foram detectados nos genes *FUT2* e *FUT3*. Foi detectada susceptibilidade (HBGA) para a infecção pelos HAdV em crianças com IRA, perfil fraco secretor e grupo sanguíneo A ou O, de acordo com valores de *Odds Ratio* (OR) calculado. As frequências dos vírus detectados principalmente para os norovírus e HAdV em crianças com DDA, demonstram a importância da etiologia viral nas DDA em crianças ≤ 5 anos de idade no período do estudo e podem estar relacionadas ao fator de susceptibilidade ao HBGA (incluindo heterogeneidade genética) e a baixa cobertura de RV1.

Palavras chaves: Rotavírus; norovírus; sapovírus; astrovírus; Adenovírus humano; bocavírus humano; Crianças da Amazônia menores ou igual a 5 anos; Doença diarreica aguda; infecção respiratória aguda; Antígenos do grupo histossanguíneo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF ACUTE DIARRHEA, CORRELATION WITH VIRAL ETIOLOGY AND BLOOD GROUP ANTIGENS IN CHILDREN \leq 5 YEARS ATTENDED AT "HOSPITAL DA CRIANÇA DE SANTO ANTONIO", BOA VISTA, RORAIMA, 2016-2017.

ABSTRACT

In this study, was evaluated the impact of acute gastroenteritis (AGE) associated with rotavirus A (RVA), norovirus, adenovirus (HAdV), sapovirus (SaV), bocavirus (HBoV) and astrovirus (HAstV) in children ≤ 5 years attended in the emergency room of "Hospital da Criança de Santo Antonio (HCSA)", Boa Vista, Roraima (RR), from October 2016 to October 2017. Feces and saliva samples were collected from 734 children, being 485 with AGE and 249 with acute respiratory infection (ARI, control group). The study was approved by CEP 1,333,480 in 11/23/2015, UFRR. RVA, norovirus, HAdV, SaV and HBoV were investigated in the 734 fecal samples and HAstV in 170 samples from children with AGE. In addition, the presence of HBoV was also investigated in 38 saliva samples; 25 from children with AGE and 13 with ARI. The susceptibility profile of ABO, Lewis and secretor of the histo-blood group antigens (HBGA) was determined for all 734 children in saliva by phenotyping and by genotyping. For the *FUT2* gene were in 166 samples and for *FUT3* gene in 42 samples. Clinical, epidemiological aspects and the coverage of the Rotarix® vaccine (RV1) were also assessed. RVA, norovirus and SaV were investigated by reverse transcription methodology followed by quantitative genomic amplification (RT-qPCR); HBoV and HAdV by quantitative genomic amplification (qPCR) and HAstV non-quantitative genomic amplification (RT-PCR). The genotyping of HBoV and detection/genotyping of HAstV was performed by PCR followed by nucleotide sequencing (Sanger method). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and touchdown PCR followed by nucleotide sequencing (Sanger) were used respectively for the phenotyping and genotyping of HBGA. In children with AGE (n=485), the following viral frequencies were observed: RVA (22.7%), norovirus (38%), HAdV (33.6%), SaV (7.3%) and HBoV (14.2%). In children with ARI (n=249), the following frequencies were observed: RVA (19.3%), norovirus (21.3%), HAdV (39.5%), SaV (5.6%) and HBoV (14.1%). The detection profile of HBoV in the 76 saliva samples paired with feces was different and correlated with the HBoV genotypes 1 to 3 detected. As for HAstV, in the 170 samples investigated, the following frequencies and genotypes were observed: classic HAstV: HAstV3 (0.60%) and HAsV5 (1.8%); Non-classic HAstV: HAstVMLB1-2 (3.5%), this one being the first description of HAstVMLB2 in Brazil. The calculated vaccination coverage for RV1 was 61% and children vaccinated in the age group between 6 and 24 months aged, had higher frequencies of RVA infection. The 734 children presented mostly (54.5%) the Lea+b+ profile (weak) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in the *FUT2* and *FUT3* genes. Susceptibility (HBGA) to HAdV infection was detected in children with ARI, weak profile and blood group A or O, according to Odds Ratio (OR) values calculated. The frequencies of viruses detected mainly for norovirus and HAdV in children with AGE, demonstrate the importance of viral etiology in AGE in children ≤ 5 years of age during the period of the study and may be related to the factor of susceptibility to HBGA (including genetic heterogeneity) and the low coverage of RV1.

Key words: Rotavirus; norovirus; sapovirus; astrovirus; Human adenovirus; human bocavirus; Amazonian children ≤ 5 years old; Acute diarrheal disease; acute respiratory infection; Histo-blood group antigens

SUMÁRIO

Capítulo I: Doenças diarreicas agudas, vírus causadores e fator de susceptibilidade ao antígeno do grupo histo-sanguíneo.....	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A doença diarreica aguda	21
1.2. Relevância mundial da doença diarreica aguda	25
1.3. A situação da doença diarreica no Brasil, na região Norte e no estado de Roraima.....	26
1.4. Agentes etiológicos virais causadores das doenças diarreicas agudas	34
1.5. Antígenos do grupo histo sanguíneo	58
2. OBJETIVOS.....	63
2.1. Objetivo Geral	63
2.2. Objetivos Específicos	63
3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS.....	64
Capítulo II: Detecção de norovirus, adenovírus, rotavirus e sapovirus e a susceptibilidade mediada pelo perfil dos antígenos do grupo histo-sanguíneo (HBGA), em crianças de 0 a 5 anos da região Amazônica (Brasil, Venezuela e República Federativa da Guiana) (Artigo 1).....	65
Capítulo III: Detecção e genotipagem de bocavirus em crianças de 0 a 5 anos da região amazônica (Brasil, Venezuela e Republica Federativa da Guiana) (Artigo 2).....	93
Capítulo IV: Primeiro relato do astrovirus humano MLB2 no Brasil detectado em fezes de crianças com gastroenterite aguda que vivem no estado de Roraima, nordeste do Brasil (Artigo 3).....	100
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
5. PERSPECTIVAS	124
6. CONCLUSÕES.....	125
Anexo I: Publicação obtida durante o doutoramento em colaboração diretamente relacionada aos objetivos da tese.....	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cartaz informativo, distribuído pelo Ministério da Saúde quanto ao Manejo da doença diarreica aguda.	25
Figura 2 - Perfil de mortalidade causada por Doença Diarreica Aguda (DDA) segundo a distribuição mundial.	26
Figura 3 - Mapa da região amazônica, composta da Amazônia Legal, Internacional e região norte do Brasil.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 4 - Número de casos de Doença Diarreica Aguda (DDA) notificados durante o período de 2007 a 2017.	30
Figura 5 - Mapa de Roraima apresentado as terras indígenas demarcadas ...	32
Figura 6 - Distribuição das notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) no estado de Roraima	33
Figura 7 - Distribuição das notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) no estado de Roraima da por faixa etária.....	33
Figura 8 - Número de notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) e casos confirmados positivos de rotavirus A.	34
Figura 9 – Estrutura dos rotavirus A (RVA).	36
Figura 10 - Resultados da cobertura vacinal da VORH.....	39
Figura 11 - Resultados da cobertura vacinal da VORH.....	40
Figura 12 - Resultados da cobertura vacinal da VORH para os 15 municípios do estado de Roraima	41
Figura 13 - Partícula dos norovirus humanos mostrando a localização externa das proteínas virais (VP1).	44
Figura 14 - Perfil epidemiológico por surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) notificados por regiões do Brasil	46
Figura 15 - Representação esquemática da organização genômica e poliproteínas dos astrovirus humanos (HAstV).....	50
Figura 16 - Representação esquemática da organização genômica e poliproteínas dos bocavirus humanos (HBoV).	54
Figura 17 - Representação esquemática da organização genômica e RNAm transcritos de acordo com as diferentes fases de transcrição dos HAdV.....	57
Figura 18 - Representação esquemática da via de biossíntese dos antígenos do grupo histo sanguíneo	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Planos de tratamento para crianças desidratadas, de acordo com a SBP (2017).	23
Quadro 2 - HAstrV “não clássicos” e distribuição nos diferentes gêneros de <i>Mamastrovirus</i>	51
Quadro 3 - Infecções associadas com as diferentes espécies e sorotipos de HAdV (Ison & Hayden, 2015).	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AB0- grupo A-B-0 de histocompatibilidade
- AGE – Do inglês: *Acute Gastroenteritis* – Gastroenterite Aguda
- AAstV1-3- avastrovírus
- CDC - Do inglês: *Centers for Disease Control and Prevention* – Centro de Controle e Prevenção das Doenças
- CT- Do inglês: *Cycle threshold* - Ciclo de Limiar
- DDA- Doença Diarreica Aguda
- DNA - Do inglês: *Deoxyribonucleic acid* – Acido Desoxirribonucleico
- DNAse- Enzima que degrada a molécula de DNA
- DTA- Doenças Transmitidas por Alimentos
- FDA - Do inglês: *Food and Drug Administration Agency* – Agência de Administração de Medicamentos e Alimentação
- FUT- Do inglês: *Fucosil Transferase* – Transferase Fucsil
- HAdV - Do inglês: *human adenovirus* - adenovírus humano
- HAstV- Astrovírus humanos clássicos (genótipos de 1 a 8)
- HAstVMLB- Astrovírus humanos não clássicos (genótipos de 1 a 3)
- HBGA- Do inglês: *Histo-Blood Group Antigens* - antígenos do grupo histo sanguíneo
- HBoV- Do inglês: *Human Bocavirus* - Bocavírus humano
- IOC- Instituto Oswaldo Cruz
- IRA- Infecção respiratória Aguda
- LACEN- Laboratório Central de Saúde
- LVCA- Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
- LRRR- Laboratório de Referência Regional para Rotavírus
- MAstV3 – mamastrovírus 3
- MAstV5 – mamastrovírus 5
- MVC - Do inglês: *Monitoring of Vaccination Coverage* – Monitoramento da Cobertura vacinal.
- MDDA- Monitorização das doenças diarreicas Agudas
- MLTU- Do inglês: *Major Late transcription Unit* - Maior Unidade de Transcrição tardia
- MS- Ministério da Saúde

NCBI- Do inglês: *National Center for Biotechnology Information* - Centro Nacional de Informação em Biotecnologia

NSPs- Do inglês: *Non-structural proteins* - Proteínas não estruturais

NGS- Do inglês: *Next Generation Sequencing* - Sequenciamento de próxima geração ou de nova geração

OMS- Organização Mundial da saúde

OPAS- Organização Pan Americana da Saúde

ORF- Do inglês: *Open Reading Frame* - Fase de Leitura aberta

PCR- Do inglês: *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase

PNI- Programa Nacional de Imunizações

qRT-PCR- Do inglês: *Reverse transcription-Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa.

RNA(+) - Do inglês: *Ribonucleic Acid positive sense* - Ácido ribonucleico de polaridade positiva

RNA(-) - Do inglês: *Ribonucleic Acid negative sense* - Ácido ribonucleico de polaridade negativa

RNA_{df} - Do inglês: *Double-stranded ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico de dupla fita

RNA_m - Do inglês: *Messenger ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_{sf} - Do inglês: *Single-ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico de fita simples

RdRp - Do inglês: *RNA-dependent RNA polymerase* - polimerase RNA dependente

RV - Rotavírus

RVA - Rotavírus A

RV1 - Do inglês: *Rotarix vaccine* - Vacina monovalente (G1P[8]) Rotarix[®] – RV1

RV5 - Do inglês: *Rotateq vaccine* - Vacina pentavalente (G1-4, P[8]) Rotateq[®]-RV5

RT-PCR- Do inglês: *Reverse transcription-Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa.

RRV-TV- Do inglês: *Rhesus-human Reassortant Rotavirus Tetravalent Vaccine* -Vacina tetravalente de rotavírus recombinante Rhesus-humana

SaV- Sapovírus

SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria

SESAU- Secretaria Estadual de Saúde

SNP- Do inglês: *Single nucleotide polymorphism* - Polimorfismo de base única

Sinan – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Sivep- Sistema de informação da vigilância Epidemiologia

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde

VORH – Vacina Oral do rotavírus humano

VP- Do inglês: *Viral Protein* - Proteína viral

VPs- Do inglês: *Structural proteins* - Proteínas estruturais

Capítulo I: Doenças diarreicas agudas, vírus causadores e fator de susceptibilidade ao antígeno do grupo histo-sanguíneo.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem a cada ano em todo o mundo 478 mil mortes de crianças menores de cinco anos de idade como consequência de doença diarreica aguda (DDA). A DDA é, atualmente, a quinta maior causa de mortes infantis, configurando-se como um importante problema de saúde pública mundialmente. As crianças ≤ 5 anos são as mais acometidas, podendo chegar ao óbito, em consequência da DDA. A morbidade é igualmente distribuída nos 5 continentes; entretanto, a morbidade é maior nos países em desenvolvimento ou mesmo regiões em um mesmo país, como o Brasil, onde há desnutrição e falta de saneamento básico (WHO, 2016).

1.1. A doença diarreica aguda (DDA)

A DDA é uma doença comum que afeta pessoas de todas as idades, com complicações potencialmente graves em crianças ≤ 5 anos e idosos, que são mais vulneráveis à desidratação (Blacklow & Greenberg, 1991).

Conceitualmente, a DDA é uma condição fisiopatológica, em que se observa aumento da frequência, de, no mínimo, três eventos em 24h, e diminuição da consistência das evacuações, associado ou não a náuseas, vômito, febre e dor abdominal. Pode ser de origem infecciosa ou não, sendo que nas infecciosas, os principais agentes etiológicos são os vírus, as bactérias, os protozoários e mesmo toxinas naturais produzidas por alguns destes agentes. Quando não infecciosas, a origem pode estar relacionada à intolerância alimentar, sais com déficit de absorção, ácidos biliares (após ressecção do íleo), gorduras não absorvíveis, alguns fármacos (por exemplo, óleo de rícino, prostaglandinas), hormônios peptídicos produzidos por tumores de pâncreas, alergênicos como glúten (doença celíaca), entre outras (Brasil, 2018).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) (SBP, 2017), as DDA podem ter origem de outras causas, além das já citadas anteriormente, como: alergia ao leite de vaca, deficiência da enzima lactase, apendicite aguda

e uso de antibióticos. A invaginação intestinal (intussuscepção) (Charles et al., 2015) deve ser considerada no diagnóstico diferencial da DDA, principalmente, no lactente. A intussuscepção é a movimentação de uma porção do intestino dentro de outra e acontece quando uma parte do intestino se adere no interior de outra, ocasionando uma obstrução do órgão. Assim, a DDA pode ser entendida como um episódio diarreico com as seguintes características: início abrupto, etiologia presumivelmente infecciosa, potencialmente autolimitada, com duração inferior a duas semanas, aumento no volume e/ou na frequência de evacuações com consequente aumento das perdas de água e eletrólitos. Apesar da definição de DDA considerar o limite máximo de duração de duas semanas, a maioria dos casos resolve-se em até uma semana (SBP, 2017).

A DDA pode ter consequências graves como desidratação, desnutrição energético-proteica e óbito.

A transmissão das DDA pode ocorrer pelas vias oral ou fecal-oral, de maneira direta e/ou indireta, sendo a primeira pelo contato com outras pessoas, por meio de mãos contaminadas e contato de pessoas com animais, e a segunda pelo consumo de água e alimentos contaminados e contato com objetos contaminados, como por exemplo, utensílios de cozinha, acessórios de banheiros, equipamentos hospitalares (SBP, 2017).

Os manipuladores de alimentos e os insetos podem contaminar, principalmente, os alimentos, utensílios e objetos capazes de reter e transportar organismos infecciosos. Locais de uso coletivo e de confinamento, como escolas, creches, hospitais e penitenciárias apresentam maior risco de transmissão das DDA. Nem sempre é possível identificar o agente causador da DDA. A presença ou não de desidratação nos casos de DDA pode ser parâmetro para categorização e definição do tratamento a ser aplicado de acordo os protocolos da SBP, apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Planos de tratamento para crianças desidratadas, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pediatria (2017).

Plano reidratação	Tipo de tratamento
Plano A	Realizado no <u>domicílio</u> , oferecendo o soro de reidratação oral e dieta líquida.
Plano B	Realizado na <u>unidade básica de saúde*</u> , oferecendo o soro de reidratação oral e acompanhamento médico constante.
Plano C	Casos graves, <u>realizado no hospital</u> , com hidratação intravenosa e avaliação dos eletrólitos.

Legenda: * = Centro de saúde do bairro, mais próximo do paciente.

O “manejo” do paciente com DDA é indicado de acordo com o grau de desidratação apresentado pelo paciente (leve, moderada, grave). Além disso, é necessário fazer a anamnese, observando-se as condições clínicas globais do paciente, incluindo olhos e fontanela, frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial, temperatura, resposta a estímulos, hidratação de mucosas, estado nutricional, capacidade de ingestão de líquidos e diurese. Todos estes parâmetros clínicos necessitam de profissionais bem treinados, o que nem sempre acontece nas unidades de saúde. A OMS, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, entre outras entidades orientam a avaliação do paciente com DDA da seguinte forma:

Grupo A: paciente bem, alerta, olhos normais, lágrimas presentes bebem normalmente, sem sede. O exame físico mostra que o sinal da prega desaparece rapidamente, tem pulso cheio e enchimento capilar normal (< 3 segundos). Não possui sinais de desidratação. Deve ser tratado com Plano A (corresponde a uma desidratação leve, anteriormente definida como Grau I).

Grupo B: paciente está irritado, intranquilo, olhos fundos, lágrimas ausentes, bebe rápido e avidamente, sedento. O exame físico mostra que o sinal da prega desaparece lentamente, tem pulso rápido, fraco e enchimento capilar prejudicado (entre 3 e 5 segundos). Possui sinais de desidratação quando tem 2 ou mais sinais descritos. Deve ser tratado

com Plano B (corresponde a uma desidratação moderada, anteriormente definida como Grau II)

Grupo C: paciente está comatoso, hipotônico, olhos muito fundos e secos, lágrimas ausentes, bebe mal ou não é capaz de beber. O exame físico mostra que o sinal da prega desaparece muito lentamente, tem pulso muito fraco ou ausente e enchimento capilar muito prejudicado (> 5 segundos). Possui sinais de desidratação grave quando tem 2 ou mais sinais descritos, sendo pelo menos um dos destacados em acima. Deve ser tratado com Plano C (corresponde a uma desidratação grave, anteriormente definida como Grau III).

Um ponto muito importante no tratamento das DDA é a manutenção da alimentação que forneça quantidade energética apropriada, sendo unânime a recomendação das diversas entidades (OMS, MS e SBP) para manter o aleitamento materno durante o quadro diarreico. Ao longo da etapa de expansão/reversão da desidratação, pode ser necessário recomendar jejum provisório, até que o paciente apresente novamente condições de ser alimentado por via oral (SBP, 2017).

O emprego do zinco (Zn^{++}) nos casos de DDA tem reduzido a duração do quadro agudo, que tende a durar menos de sete dias, além de prevenir novas ocorrências nos três meses subsequentes, estando indicado nos quadros de DDA nas crianças ≤ 5 anos (SBP, 2017). A vitamina A tem sido administrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde as crianças apresentam carência desta vitamina (Rocha et al., 2015). Estas medidas reduzem o risco de hospitalização e de mortalidade por DDA.

Em meados do ano de 2016, o MS distribuiu para as Unidades de Saúde um cartaz, com a obrigatoriedade de ser afixado, com todas as informações para o Manejo das DDA, devido ao grande impacto desta doença na morbimortalidade infantil (Figura 1).

MANEJO DO PACIENTE COM DIARREIA

AVALIAÇÃO DO ESTADO DE HIDRATAÇÃO DO PACIENTE

ETAPAS	A	B	C
OBSERVE			
Estado geral	Bem, alerta	Irritado, irritacioso	Comatoso, hipotônico*
Olhos	Normais	Fundos	Muito fundos e secos
Lágrimas	Presentes	Ausentes	Ausentes
Sede	Beba normal, sem sede	Sedento, bebe rápido e avidamente	Bebe mal ou não é capaz de beber*
EXPLORE			
Sinal de prega	Desaparece rapidamente	Desaparece lentamente	Desaparece muito lentamente (mais de 2 segundos)
Pênis	Chico	Rápido, fraco	Muito fraco ou ausente*
DEBIDA			
SEM SINAIS DE DESIDRATAÇÃO		Se apresentar dois ou mais sinais: INICIAR COM DESIDRATAÇÃO	Se apresentar dois ou mais sinais, incluindo pelo menos um dos descritos em qualquer 1º) DESIDRATAÇÃO GRAVE
TRATE			
USE O PLANO A		USE O PLANO B	USE O PLANO C

**PLANO A
PARA PREVENIR A DESIDRATAÇÃO NO DOMICÍLIO**

Explicar ao paciente ou acompanhante para ficar no domicílio:

- 1) **ORIENTAR O INGERIR NAIS LÍQUIDO QUE O HABITUAL PARA PREVENIR A DESIDRATAÇÃO.**
 - O paciente deve beber líquido quente (água de amêijo, sem açúcar, chá, suco e soro) ou Solução de Reidratação Oral (SRO) após cada evacuação líquida.
 - Não utilizar refrigerantes e não adoçar o chá ou suco.
- 2) **MANEJO DA ALIMENTAÇÃO HABITUAL PARA PREVENIR A DESIDRATAÇÃO.**
 - Continuar o aleitamento materno.
 - Manter a alimentação habitual para as crianças e os adultos.

USE O PACIENTE NÃO MELHORAR EM DOIS DIAS OU SE APRESENTAR QUALQUER UM DOS SINAIS ABAXO, LEVÁ-LO IMEDIATAMENTE AO SERVIÇO DE SAÚDE.

SINAIS DE PERIGO

- Fome na diarreia
- Vômitos repetidos
- Muita sede
- Secura de alimentos
- Sangue nas fezes
- Diminuição da diurese

ORIENTAR O PACIENTE OU ACOMPANHANTE PARA:

- Reconhecer os sinais de desidratação.
- Preparar e administrar a Solução de Reidratação Oral.
- Praticar medidas de higiene pessoal e domicílio (lavagem adequada das mãos, tratamento de água e higienização dos alimentos).

ADMINISTRAR SORO UMA VEZ AO DIA, DURANTE 10 A 14 DIAS

- Até aos (5) meses de idade: 10mg/dia.
- Hebreos de seis (6) meses de idade: 20mg/dia.

IDADE	Quantidade de soro que devem ser administrados/ingridos após evacuação líquida
Hebreos de seis (6) meses de idade	20-100ml
De 1 a 10 anos	100-300ml
Hebreos de 10 anos	Quantidade que o paciente aceitar

**PLANO B
PARA TRATAR A DESIDRATAÇÃO POR VIA ORAL NA UNIDADE DE SAÚDE**

1) ADMINISTRAR SOLUÇÃO DE REIDRATAÇÃO ORAL:

- A quantidade de solução ingerida depende da rede do paciente.
- A SRO deve ser administrada continuamente, até que desapareçam os sinais de desidratação.
- Apenas como orientação inicial, o paciente deverá receber de 50 a 100ml/kg para ser administrado no período de 4-6 horas.

2) DURANTE A REIDRATAÇÃO REAVALIAR O PACIENTE SEGUINDO AS ETAPAS DO QUADRO "AVALIAÇÃO DO ESTADO DE HIDRATAÇÃO DO PACIENTE"

- Se se desaperceçam os sinais de desidratação, utilize o PLANO A.
- Se continuar desidratado, iniciar a sonda nasogástrica (gastrostomia).
- Se o paciente evoluir para desidratação grave, seguir o PLANO C.

3) DURANTE A PERMANÊNCIA DO PACIENTE OU ACOMPANHANTE NO SERVIÇO DE SAÚDE ORIENTAR A:

- Reconhecer os sinais de desidratação.
- Preparar e administrar a Solução de Reidratação Oral.
- Praticar medidas de higiene pessoal e domicílio (lavagem adequada das mãos, tratamento de água e higienização dos alimentos).

O PLANO B DEVE SER REALIZADO NA UNIDADE DE SAÚDE DE PACIENTES QUE NÃO RESPONDEM NA UNIDADE DE SAÚDE ATÉ A REIDRATAÇÃO COMPLETA.

**PLANO C
PARA TRATAR A DESIDRATAÇÃO GRAVE NA UNIDADE HOSPITALAR**

O PLANO C CONTEMPLA DUAS FASES PARA TODAS AS FAIXAS ETÁRIAS:

A FASE RÁPIDA É A FASE DE MANUTENÇÃO E REPOSIÇÃO

SOLUÇÃO	VOLUME	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO
Soro fisiológico a 0,9%	Iniciar com 20ml/kg de peso. Repetir essa quantidade até que a criança esteja hidratada, reavaliando os sinais vitais após cada hora de soro administrado.	30 minutos
2 Soro fisiológico a 0,9% 2 Soro Lactado de Solução Polissacarilato	Por indicação médica o enfermeiro deve começar com 10ml/kg de SRO.	

AVALIAR O PACIENTE CONTINUAMENTE

SOLUÇÃO	VOLUME TOTAL	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO
2 Soro fisiológico a 0,9%	20ml/kg	30 minutos
2 Soro fisiológico a 0,9% 2 Soro Lactado de Solução Polissacarilato	20ml/kg	2 horas a 30 minutos

FASE DE MANUTENÇÃO E REPOSIÇÃO PARA TODAS AS FAIXAS ETÁRIAS

SOLUÇÃO	VOLUME EM 24 HORAS
Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9%	Para até 10 kg 100ml/kg Para de 10 a 20kg 100ml + 50ml/kg de peso que exceder 20kg Para acima de 20kg 100ml + 20ml/kg de peso que exceder 20kg
Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9% Soro fisiológico a 0,9%	Para até 10 kg 100ml/kg Para de 10 a 20kg 100ml + 50ml/kg de peso que exceder 20kg Para acima de 20kg 100ml + 20ml/kg de peso que exceder 20kg
ICI a 10%	2ml para cada 100ml de solução de fase de manutenção.

AVALIAR O PACIENTE CONTINUAMENTE SENDO INICIA A MELHORIA DA DESIDRATAÇÃO, AUMENTAR A VELOCIDADE DE INFUSÃO

- Quando o paciente puder beber, ingerir 2 a 3 horas após o início de reidratação, iniciar a reidratação por via oral com SRO, mantendo a reidratação endovenosa.
- Interromper a reidratação por via endovenosa somente quando o paciente puder ingerir SRO em quantidade suficiente para se manter hidratado. A quantidade de SRO necessária varia de um paciente para outro, dependendo do volume das evacuações.
- Lembrar que a quantidade de SRO a ser ingerida deve ser maior nas primeiras 24 horas de tratamento.
- Observar o paciente por pelo menos seis (6) horas.

OS PACIENTES QUE ESTIVEREM SENDO REIDRATADOS POR VIA ENDOVENOSA DEVEM PERMANECER NA UNIDADE DE SAÚDE ATÉ QUE ESTEJAM HIDRATADOS E CONSIDERADO MANEJO A HIDRATAÇÃO POR VIA ORAL.

IDENTIFICAR DISENTERIA E/OU OUTRAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS A DIARREIA

1) PERGUNTAR SE O PACIENTE TEM SANGUE NAS FEZES

Em caso positivo e com comprometimento do estado geral:

- Realizar o paciente de acordo com os planos A, B ou C.
- Iniciar antibióticos.

Tratamento de crianças:

- Ciprofloxacino 15 mg/kg a cada 12 horas, via oral, por 3 dias.
- Ceftriaxona 50 a 50mg/kg intramuscular, uma vez ao dia, por 2 a 5 dias, como alternativa.

• Orientar o acompanhante para administrar líquidos e manter a alimentação habitual, caso o tratamento seja realizado no domicílio e reavaliar o paciente após dois dias.

- Se mantiver presença de sangue nas fezes após 48 horas do início do tratamento, encaminhar para internação hospitalar.

Observação: crianças com quadro de desidratação devem ter o primeiro atendimento em qualquer Unidade de Saúde, devendo-se iniciar hidratação e antibioticoterapia de forma iniciada, até que chegue ao hospital.

Tratamento de adultos:

- Ciprofloxacino 500 mg de 12/12h, via oral, por 3 dias.
- Orientar o paciente ou acompanhante para administrar líquidos e manter a alimentação habitual, caso o tratamento seja realizado no domicílio.
- Reavaliar o paciente após 2 dias.
- Se mantiver presença de sangue nas fezes ou melena após 48 horas do início do tratamento:
- Se o paciente estiver com condições gerais boas, iniciar Ceftriaxona 2g via intramuscular, 1 vez ao dia, por 2 a 5 dias.
- Se estiver com condições gerais comprometidas, encaminhar para internação hospitalar.

2) PERGUNTAR QUANDO INICIOU A DIARREIA

Se vier mais de 14 dias de evolução:

- 1) Encaminhar o paciente para a unidade hospitalar se:
 - menor que seis meses.
 - apresentar sinais de desidratação. Neste caso, reidratar o primeiro e em seguida encaminhar a unidade hospitalar.
- 2) Quando não houver condições de encaminhar para a unidade hospitalar, orientar o responsável/acompanhante para administrar líquidos e manter a alimentação habitual no domicílio.
- 3) Se o paciente não estiver com sinais de desidratação e não for maior de seis meses, encaminhar para consulta médica para investigação e tratamento.

3) OBSERVAR SE TEM DESIDRATAÇÃO GRAVE

Se a criança estiver com desidratação grave (utilizar para diagnóstico e Casamento de Saúde do Criança do Ministério da Saúde):

- Em caso de desidratação, iniciar a reidratação e encaminhar o paciente para o serviço de saúde.
- Dirigir ao paciente ou responsável envelope de SRO em quantidade suficiente e recomendar que continue a hidratação até que chegue ao serviço de saúde.

4) VERIFICAR A TEMPERATURA

Se o paciente estiver além de diarreia, com a temperatura de 38°C ou mais, investigar e tratar outras possíveis causas, por exemplo, pneumonia, úlcera, angina, meningite, infecção urinária.

USE DE MEDICAMENTOS EM PACIENTES COM DIARREIA

- Antibióticos devem ser usados somente para casos de diarreia com sangue (disenteria) e comprometimento do estado geral ou em caso de colera grave. Em outras condições, os antibióticos são ineficazes e não devem ser usados.
- Antiperistálticos devem ser usados somente para:
 - Amebíase, quando o tratamento de diarreia por Zingibã, após 72 horas, ou em caso em que se identificam nos fezes bacteriologicamente diarreia histotóxica englobando hemáticas.
 - Diarreia, quando a diarreia dura 14 dias ou mais, se caracterizam como os tóxicos nas fezes ou no aspecto intestinal.
- Soro deve ser administrado, uma vez ao dia, durante 10 a 14 dias:
 - Até aos (6) meses de idade: 10mg/dia.
 - Hebreos de seis (6) meses de idade: 20mg/dia.

ANTIDIARRÉICOS E ANTIESPASMÓDICOS NÃO DEVEM SER USADOS

Figura 1 Cartaz informativo, distribuído pelo Ministério da Saúde em 2016, quanto ao Manejo de portadores da doença diarreica aguda (DDA).

1.2. Relevância mundial da doença diarreica aguda

A Figura 2 apresenta o perfil de mortalidade mundial que ocorre em crianças <5 anos de idade causado por DDA (GBD: Diarrhoeal Disease Collaborators, 2016). Em países de baixa renda localizados na África e Ásia a mortalidade está acima de 100 mortes por 100.000 habitantes e por isso as DDA são a principal causa de óbitos, segundo a OMS. Em países de renda média localizados na América do Sul, Central, e alguns países da África, a mortalidade está entre 10 até 100 mortes por 100.000 habitantes; sendo que nestes países (incluindo o Brasil) as DDA representam a quinta causa de óbitos em crianças <5 anos de idade. Em países com alta renda, do continente Europeu e Cuba principalmente, a mortalidade causada por DDA não é superior a 10 mortes por 100.000 habitantes (GBD: Diarrhoeal Disease Collaborators, 2016).

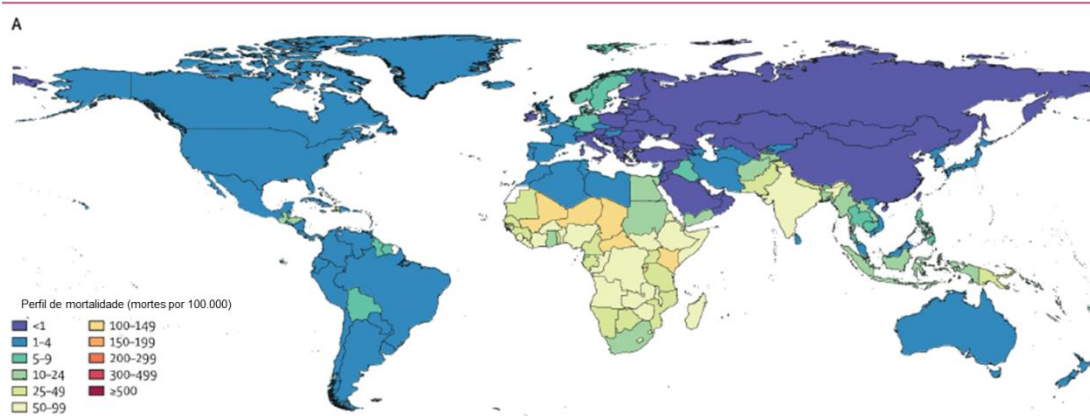


Figura 2 - Perfil de mortalidade causada por Doença Diarreica Aguda (DDA) segundo a distribuição mundial. Adaptado de GBD: Diarrhoeal Disease Collaborators, 2016.

A morbidade devido a DDA ocorre principalmente em países onde as condições de saneamento básico são precárias, a disponibilidade de água tratada é limitada e a qualidade dos alimentos é duvidosa quanto ao preparo e higienização. Como consequência, a morbidade causada por DDA representa, ainda, gastos para o sistema de saúde. Embora nas últimas décadas a mortalidade associada às DDA tenha diminuído significativamente, a morbidade não seguiu esta mesma tendência de redução (Mokomane et al., 2018). As medidas que reduziram a mortalidade causada por DDA foram principalmente condutas aplicadas nas unidades de saúde pública, tais como a reidratação oral e a promoção do aleitamento materno (Mokomane et al., 2018).

1.3. A situação da doença diarreica no Brasil, na região Norte e no estado de Roraima.

No Brasil, a DDA passou da 8ª causa de morte, em 1990, para a 30ª em 2010, com redução de 82%. Em relação à morte prematura, passou do 4º lugar, em 1990, para o 25º, em 2010; e de uma maneira geral, houve diminuição das mortes por DDA para o período de 1990 a 2010 (Brasil, 2017). Diante da magnitude das DDA, em 1992, foi implantada uma Vigilância Sentinela, denominada “Monitorização das DDA” (MDDA). Atualmente, é designada Vigilância Epidemiológica das DDA e regulamentada pela Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017 (Anexo XLIII).

Desde 2006, os casos atendidos nas unidades de saúde sentinelas (US) são registrados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarreicas Agudas (Sivep-DDA) (Brasil, 2017).

Os casos individuais de DDA são de notificação compulsória em unidades sentinelas (MDDA). O principal objetivo da Vigilância Epidemiológica das DDA é monitorar o perfil epidemiológico dos casos, visando detectar precocemente surtos, especialmente os relacionados ao acometimento entre menores de cinco anos; agentes etiológicos virulentos e epidêmicos, como é o caso da cólera; situações de vulnerabilidade social; seca, inundações e desastres ambientais. O monitoramento dos casos registrados no Sivep-DDA é realizado pelo acompanhamento contínuo dos níveis endêmicos para verificar alteração do padrão da doença em localidades e períodos de tempo determinados. Diante da identificação de alterações no comportamento da doença, devem ser realizadas investigação e avaliação de risco para subsidiar as ações necessárias (Brasil, 2017).

Em 2017 a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)-MS apresentou resultados baseados em um estudo descritivo sobre a morbimortalidade das DDA no Brasil coletando informações deste agravo notificadas no período de 2000 a 2015. Os dados apresentados foram os seguintes:

1. Entre o período de 2007 a 2015, foram registrados, no Brasil, 34.568.644 casos de DDA atendidos em US para MDDA. O número de casos de DDA registrados em 2015 foi de 4.231.052, aproximadamente 12,5% de casos a menos que em 2014. Quanto ao comportamento das DDA nas regiões, a Sudeste e a Sul têm apresentado ascensão do número de casos ao longo dos anos, enquanto que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam comportamento com pequenas variações (Brasil, 2017);
2. Entre 2007 e 2014, observa-se em todas as regiões do Brasil, aumento sazonal nos períodos referentes aos meses de janeiro a abril e de agosto a setembro;

3. Considerando os 34.568.644 casos registrados no período de 2007 a 2015 no Brasil, as faixas etárias mais acometidas por DDA foram as maiores de 10 anos (55%), seguidos das faixas de 1 a 4 anos (25%), de 5 a 9 anos (12%) e menores de 1 ano (7%). O mesmo perfil foi observado em 2015, embora o percentual de casos na faixa etária de maiores de 10 anos tenha sido de 61% e na faixa etária de 1 a 4 anos de 20%.

4. Quinze por cento dos óbitos por DDA que ocorreram no ano de 2015 foram de crianças ≤ 5 anos; embora entre os anos de 2000 a 2015, tenha-se verificado um declínio na tendência da taxa de mortalidade por DDA no Brasil, com redução de aproximadamente 0.11 ao ano.

A região Norte do Brasil é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima (RR) e Tocantins. Ela está localizada entre o maciço das Guianas (ao Norte), o Planalto Central (ao Sul), a Cordilheira dos Andes (a Oeste) e o Oceano Atlântico (a Noroeste). Esta região está dentro da região amazônica, que inclui a Amazônia Internacional (Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, República Cooperativista da Guiana, Guiana Francesa e Suriname) e Amazônia Legal, que compreende os estados da região Norte e os estados do Maranhão e Mato Grosso (Figura 3).

Com extensão territorial de 3.853.322,2 Km², a região Norte é a maior do território brasileiro, correspondendo a 45% da área total do país. Quanto aos aspectos físicos, o Norte possui as seguintes características: o clima predominante é o equatorial, apresentando temperaturas elevadas e altos índices pluviométricos e de umidade, a vegetação é abundante, composta pela floresta Amazônica, e a hidrografia é representada pelos grandes rios das bacias hidrográficas Amazônica e do Tocantins. Conforme contagem populacional realizada em 2010, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população total é de 15.864.454 habitantes, dos quais 73,5% residem em áreas urbanas. A região Norte apresenta a densidade populacional de 4,1 habitantes/Km², sendo esta a menor por região brasileira.

O crescimento demográfico é de 2,1% ao ano, considerada a maior média do Brasil.

Sua população apresenta grande heterogeneidade, pois aproximadamente 228 mil índios de diversas etnias vivem nessa região. No que tange aos aspectos negativos, os estados da região Norte, além das dificuldades de locomoção relacionadas à geografia, apresentam problemas sociais graves, tais como: insuficiência de saneamento básico, analfabetismo (atingindo 10% da população) e a mortalidade infantil (23,5 a cada mil nascidos vivos) (IBGE, 2010).



Figura 3 – Mapa da região amazônica, composta da Amazônia Legal, Internacional e região Norte do Brasil. Fonte: Portal Paramazônia 2016.

Os casos notificados de DDA na região Norte do Brasil correspondem a 13% do total do país, em relação aos outros estados brasileiros (período correspondente aos anos de 2007 a 2015) e ocorrem principalmente nos meses de janeiro a maio (Brasil, 2017).

A Figura 4 (Sivep DDA/VEDDA/SVS/Ministério da Saúde) claramente mostra a manutenção do número de casos (morbidade) de DDA notificados na região Norte entre os anos de 2007 a 2017. Entretanto, houve um declínio na taxa de mortalidade no mesmo período na região (Brasil, 2017).

Número de casos de DDA registrados por ano e região. Brasil, 2007 a 2017.

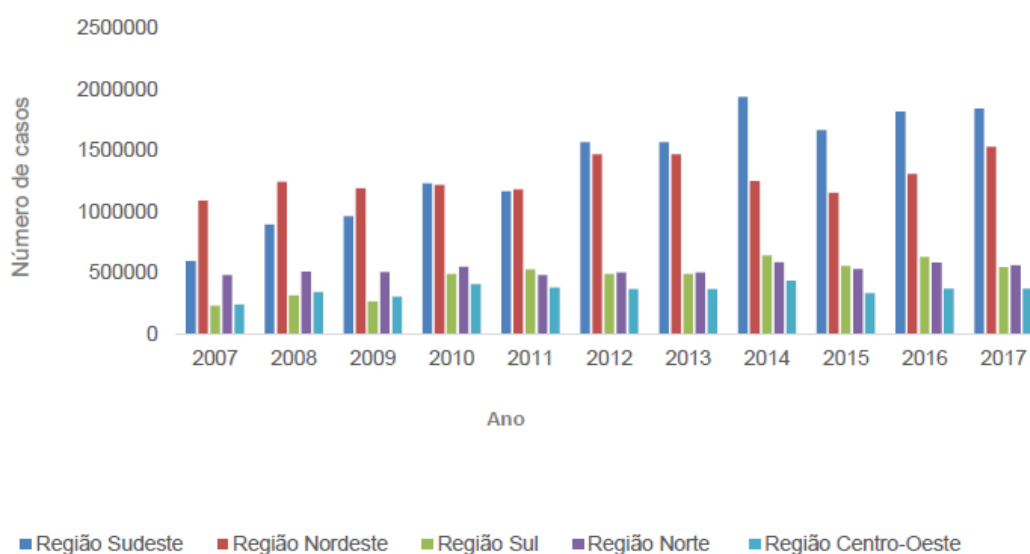


Figura 3 – Número de casos de Doença Diarreica Aguda (DDA) notificados durante o período de 2007 a 2017, registrado pelo sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde (Sivep_DDA/VEDDA/SVS/Ministério da Saúde).

O estado de Roraima (RR) é um dos sete estados da região Norte do Brasil. Tem como limites geográficos a Venezuela, ao Norte e Noroeste; Republica Federativa da Guiana, ao Leste; Pará, ao Sudeste; e Amazonas, ao Sul e Oeste. Ocupa uma área aproximada de 224.300,506 mil km² e sua capital é Boa Vista. O estado é o menos populoso e com a menor densidade demográfica na federação: população de 605.761 e 2,33 habitantes/km², respectivamente (IBGE, 2010). Sua economia, baseada principalmente no setor terciário, registra uma alta taxa de crescimento, embora seu Produto Interno Bruto (PIB) de \$ 9,027 bilhões represente apenas 0,15% do PIB brasileiro, o menor do país. Situado numa região periférica da Amazônia Legal,

no Noroeste da região Norte do Brasil, a floresta amazônica é o que predomina em RR. O clima varia de acordo com a região territorial: a) clima equatorial (quente e úmido) nas regiões Norte, Sul e Oeste do estado; com a temperatura média anual de 24°C; b) clima tropical na região Leste do estado, com estação seca bem definida, com a temperatura média de 24°C e menor índice pluviométrico. O estado de RR possui uma extensa hidrografia e faz parte da bacia do rio Amazonas, baseando-se basicamente na sub-bacia do rio Branco (45.530 km²), um dos efluentes do rio Negro, o maior e mais importante do estado.

Roraima é constituído por 15 municípios, tendo a população roraimense das seguintes etnias: brancos (24%), negros (4%), pardos (61%) e indígenas (11%). De acordo com a Fundação Nacional do Índio (FUNAI), a população indígena é formada por 46.106 pessoas. No entanto, nem todos se declararam indígenas, ocasionando um aumento no percentual de indivíduos pardos. A população indígena está dividida nas seguintes etnias: Yanomamis (15.000); Ingaricó, Macuxi, Patamona, Taurepang, Waimiri-Atroari, Wai-Wai e Wapixana (31.106). O Atlas Digital do Brasil 2016, lançado IBGE, apontou que 83,2% da população indígena de RR vive em terras demarcadas, o maior percentual entre todos os estados brasileiros. A Figura 5 apresenta as terras demarcadas do estado de RR (IBGE, 2010)

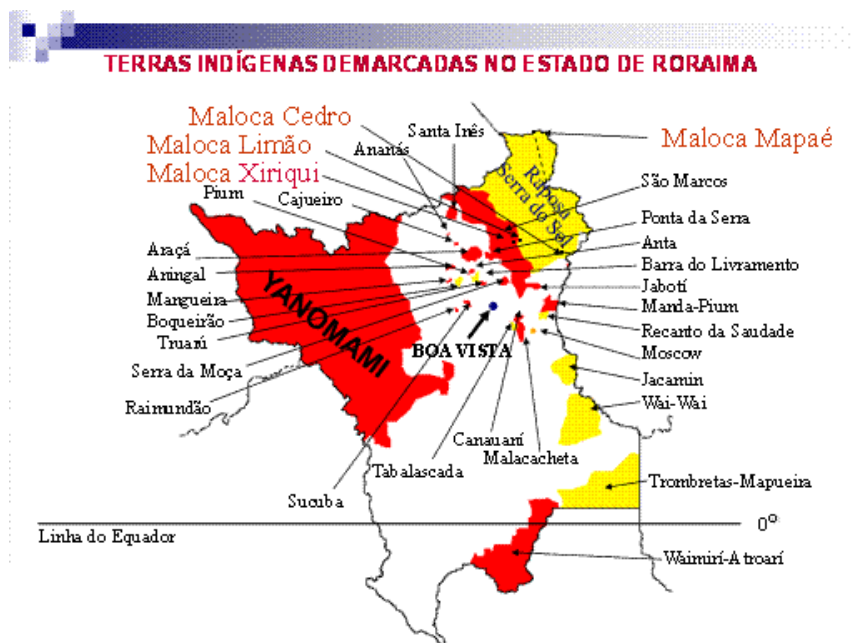


Figura 4 - Mapa de Roraima apresentando as terras indígenas demarcadas (IBGE, 2010).

Entre os anos de 2014 e 2017, foram notificados, mediante o preenchimento das planilhas da área técnica e do Sivep-DDA no estado de RR, 90.558 casos de DDA; sendo 18.762 casos em 2017. Na semana epidemiológica (SE) 07, foi verificado um aumento de números de casos detectados pelo MDDA em RR: 556 casos no total; sendo 48 em crianças ≤ 1 ano de idade; 171 em crianças >1 e ≤ 4 anos de idade; 57 em crianças >4 e ≤ 9 anos de idade; e 280 crianças ≥ 9 anos de idade. No município de Iracema esse aumento foi significativo, passando de zero na SE 01, para 24 casos na SE 07, reduzindo e se mantendo estável nas semanas seguintes. Os municípios de Boa Vista, Caracaraí e Rorainópolis apresentaram um número de notificações maior em 2016 em relação aos outros anos. Foram 131 unidades sentinelas monitorando, o que pode ter contribuído com o aumento no número de casos deste ano, segundo o Relatório Anual de Epidemiologia 2017. O ano de 2017 apresentou o menor número de casos para os municípios de Alto Alegre, Boa Vista, Caracaraí, Caroebe, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São Luiz e Uiramutã, até a semana epidemiológica 47. Em relação à prevalência das DDA por idade, observa-se que a faixa etária mais acometida foi a de ≥ 10 anos de idade.

Isto, segundo o Relatório Anual de Epidemiologia 2017 (SESAU-RR, 2018), se deve principalmente ao número de crianças que compõem essa faixa etária. Cabe ressaltar, contudo, que o perfil epidemiológico das DDA nos dias de hoje vem se alterando, tendo em vista, principalmente, o surgimento de novos patógenos denominados emergentes. As Figuras 6 e 7 resumem a situação das DDA em RR (SESAU-RR, 2018). A Figura 8 representa a situação das DDA em que os rotavírus A (RVA), foram identificados como o agente etiológico.

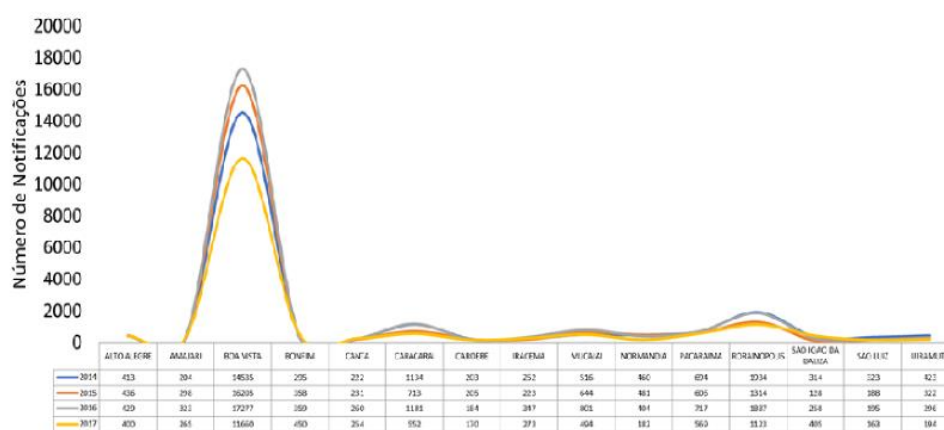


Figura 5 - Distribuição das notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) no estado de Roraima da 1ª Semana Epidemiológica de 2014 até a 47ª de 2017 (SESAU-RR, 2018).

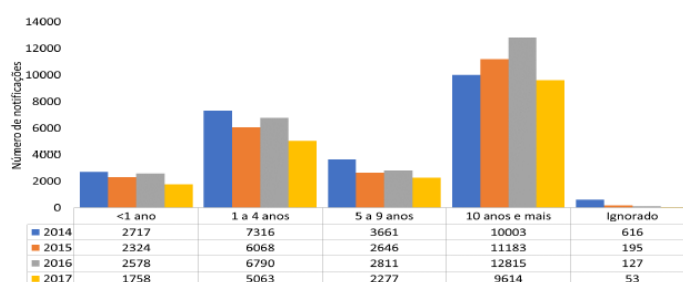


Figura 6 - Distribuição das notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) no estado de Roraima por faixa etária no período de 2014 a 2017 (SESAU-RR, 2018).

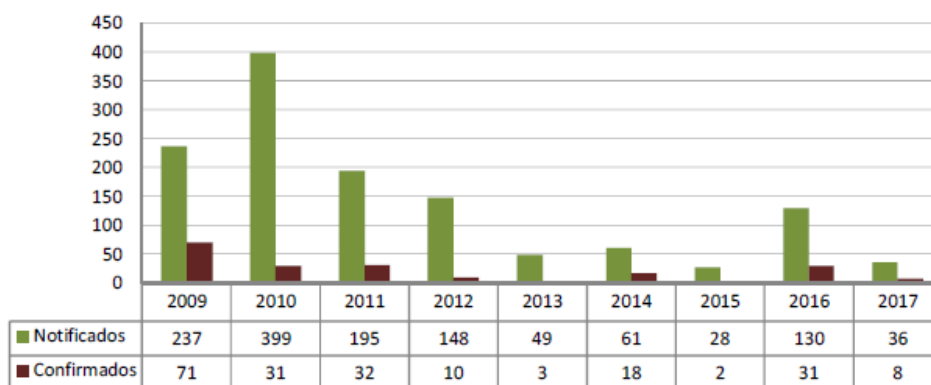


Figura 7 - Número de notificações de Doença Diarreica Aguda (DDA) e casos confirmados positivos para rotavírus A no período de 2009 a 2017 (SESAU-RR, 2018).

1.4. Agentes etiológicos virais causadores das doenças diarreicas agudas

Na década de 1970, amostras fecais oriundas de crianças com DDA, analisadas pela metodologia de Microscopia Eletrônica (ME), permitiram a identificação de dois principais vírus responsáveis pela etiologia das DDA: os rotavírus A (RVA) (Bishop et al., 1973; Flewett et al., 1973) e os norovírus, denominado inicialmente de *Norwalk virus* (Kapikian et al., 1972; Kapikian, 2000). A partir destas descrições e através da ME outros vírus foram descritos relacionados à etiologia das DDA.

Atualmente, vários agentes virais têm sido relacionados à ocorrência das DDA; com frequências de detecção maiores ou menores dependendo dos países ou de uma determinada região, conforme revisado recentemente. Entretanto, apesar dos avanços nas tecnologias disponíveis de diagnóstico, 50% dos casos das DDA não têm etiologia definida (Malik et al., 2019).

Para este estudo, foram eleitos os RVA, norovírus, sapovírus, Adenovírus humanos (HAdV); também foi investigada a presença dos Astrovírus humanos clássicos (HAstV, genótipos de 1 a 8), não clássicos (HAstVMLB, genótipos 1 a 3) e bocavírus humanos (HBoV), cujas características biológicas e epidemiológicas, são descritas a seguir.

1.4.1. Os rotavírus A

Os rotavírus causam de 25-65% das DDA infantis graves em todo o mundo. São classificados na família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Dez espécies diferentes de *rotavírus* (A – J) foram identificadas e classificadas com base nas diferenças de sequência e antigenicidade da proteína viral VP6, que constitui o capsídeo intermediário da partícula viral. Os RVA são os principais agentes etiológicos virais da DDA em crianças ≤ 5 anos de idade, em todo o mundo (Crawford et al., 2018).

O genoma dos RVA é constituído por ácido ribonucléico (RNA), fita dupla (dsRNA), contendo 11 segmentos, são desprovidos de envelope, possuem uma arquitetura complexa de três capsídeos concêntricos, que envolvem o dsRNA (Figura 9). Os segmentos de dsRNA codificam seis proteínas virais estruturais: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; e seis proteínas não estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. Cada segmento genômico codifica uma proteína viral (monocistronico); sendo exceção o segmento 11 que codifica duas proteínas: NSP5 e NSP6 (Figura 9).

As VPs, que constituem a partícula viral madura, determinam a especificidade do hospedeiro, o reconhecimento do receptor celular para adsorção e penetração na célula e contém os epítomos responsáveis pela ativação da resposta imune. As NSPs estão envolvidas na replicação do genoma e no antagonismo da resposta imune inata (um papel particular para a NSP1) e enterotoxina viral NSP4, responsável pelo mecanismo secretório da DDA. A proteína VP4 é proteoliticamente clivada em VP8* e VP5*. A proteína estrutural VP2, as enzimas VP1 e VP3 e o genoma viral compõem o núcleo viral da partícula infecciosa. A proteína VP6 determina as especificidades de espécies, grupos e subgrupos. A camada externa do capsídeo é composta por duas proteínas, VP7 e VP4, que induzem uma resposta imune em hospedeiros infectados, levando à produção de anticorpos específicos para o RVA (revisado por Crawford et al., 2018).

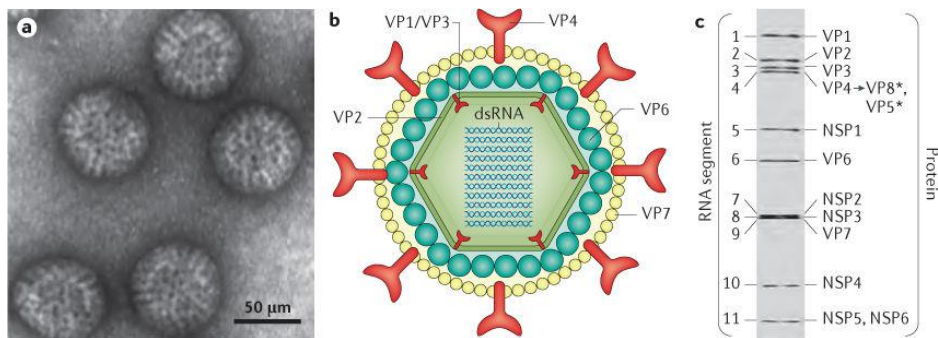


Figura 8 – Estrutura dos rotavirus A (RVA): a) micrografia eletrônica de partículas dos RVA; b) esquema representativo da partícula viral, com triplo capsídeo: capsídeo interno constituído pela proteína viral (VP) 2; capsídeo intermediário constituído pela VP6; capsídeo externo constituído pelas VP4 e VP7; c) perfil de migração eletroforética dos 11 segmentos de dsRNA viral, com a identificação das respectivas proteínas codificadas para o RVA símio (SA11), adaptada de Crawford e colaboradores (2018).

Os RVA possuem uma classificação binária: genótipos G e genótipos [P], com base na sequência nucleotídica dos segmentos 7, 8 ou 9 (VP7) e 4 (VP4). Nesta classificação binária, o genótipo G (glicoproteína), corresponde à sequência nucleotídica que codifica para a proteína VP7; enquanto o genótipo P (protease sensível) corresponde ao segmento genômico que codifica para a proteína VP4. Até o momento, 36 genótipos G e 51 genótipos P de RVA foram descritos mundialmente. Entretanto, seis genótipos G (G1, G2, G3, G4, G9 e G12) e três genótipos P (P[4], P[6] e P[8]) são prevalentes mundialmente, sendo representados pelas seguintes combinações binárias: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] (Carvalho-Costa et al., 2019).

Uma nova proposta de classificação, principalmente para cepas menos comuns e que necessitam uma melhor caracterização, principalmente para se determinar a potencial origem animal, estudos de evolução viral, estudos de recombinação gênica foi denominada de “constelação gênica” (Matthijnssens et al., 2011). Para esta classificação, há a necessidade do sequenciamento completo dos 11 segmentos genômicos (Matthijnssens et al., 2018).

1.4.1.1. Vacinas para rotavírus A

O desenvolvimento de uma vacina para prevenir a infecção pelos RVA e diminuir a mortalidade e morbidade pelas DDA e que fosse eficaz e inócua, foi prioridade nas ações da OMS. O objetivo principal era a redução da morbimortalidade das crianças nos dois primeiros anos de vida. Os estudos com as candidatas à vacina evoluíram desde os chamados procedimentos Jennerianos (Vesikari et al., 1984), utilizando cepas de RVA oriundas de animais; seguido das vacinas de segunda geração, até estratégias que envolvem técnicas de engenharia genética. Dentre as várias estratégias vacinais desenvolvidas, destacaram-se:

A Rhesus-human Reassortant Rotavirus Tetravalent Vaccine (RRV-TV) foi a primeira vacina contra RVA avaliada no Brasil, sendo testada nos meados da década de 1990, em Belém, Pará (Linhares et al., 1996). A RRV-TV envolveu o rearranjo genético entre quatro cepas atenuadas de origens símia e humana (4×10^4 pfu/dose) e foi objeto de estudos clínicos realizados em países desenvolvidos e na América do Sul: Peru, Brasil e Venezuela. Os resultados indicaram eficácia em relação aos episódios mais graves, alcançando índices comparáveis aos outros estudos com tal imunizante em concentrações mais elevadas (Joensuu et al., 1997; Pérez-Schael et al., 1997).

A análise dos resultados da RRV-TV alcançados nos vários ensaios clínicos ensejou em julho de 1998 no licenciamento da primeira vacina RVA nos Estados Unidos da América (EUA), denominada de Rotashield[®], com a recomendação do esquema de três doses: aos 2, 4 e 6 meses de idade (CDC, 1999a). Entretanto, nove meses depois e com mais de um milhão de doses aplicadas em aproximadamente 500 mil crianças nos EUA, a vacina foi retirada do programa de imunização. Esta decisão foi fundamentada em ampla avaliação de casos notificados de intussuscepção associada à vacina (CDC, 1999b). As análises subsequentes dos dados registrados confirmaram esta correlação, porém com o risco estimado entre 1/10.000 a 1/32.000, e com maior ocorrência no terceiro a décimo quarto dia após a primeira dose, em crianças acima dos 3 meses de idade, o que evidenciou nítida associação com a faixa etária (Murphy et al., 2003). Os ensaios clínicos com esta vacina foram descontinuados.

Em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) e a OMS declararam que a introdução de uma vacina para RVA era prioridade nas Américas com a meta de prevenir mortes e hospitalizações causadas por este vírus. Duas vacinas foram então recomendadas: a monovalente Rotarix[®] (RV1) que deriva de uma amostra humana atenuada (G1P[8], cepa RIX4414) (Ruiz-Palacios et al., 2006); e a pentavalente RotaTeq[®] (RV5), originada a partir de reestruturações genéticas entre amostras humanas e bovina, que contém os RV genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8] (Vesikari et al., 2006).

Até o momento, 95 países incorporaram uma das duas vacinas disponíveis em seu Programa Nacional de Imunizações (PNI) e alguns países como a Austrália, disponibilizam as duas vacinas. O Brasil introduziu a RV1 em seu PNI em março de 2006, entretanto a vacina RV5 encontra-se disponível em clínicas privadas. Dados de oito países de alta renda e países de renda média demonstraram um declínio de 49-89% nas internações hospitalares associadas aos RVA e um declínio de 17 a 55% em internações hospitalares associadas à DDA causadas por todas as causas entre crianças ≤ 5 anos de idade, logo nos dois primeiros anos de introdução das vacinas (Bányai et al., 2018). Estudos realizados no Brasil e América Latina demonstraram redução da morbimortalidade e das hospitalizações associadas à DDA tendo como agente etiológico o RVA (do Carmo et al., 2011; Ichihara et al., 2014; Linhares & Justino, 2014; de Oliveira et al., 2015).

Como descrito, a RV1 é a vacina utilizada pelo PNI do Brasil. Considerada de caráter estratégico a sua produção nacional pelo MS, em 2008 o Instituto de Tecnologias em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz) assinou com a multinacional GlaxoSmithKline[®] um acordo de transferência de tecnologia. A apresentação da vacina é uma suspensão oral (vacina oral para rotavírus humano, VORH), contendo no mínimo 106,0 CCID50 de vírus atenuado em excipientes. A VORH é indicada em duas doses, seguindo os limites de faixa etária: primeira dose aos dois meses (limites de 1 mês e 15 dias até, no máximo, 3 meses e 15 dias) e a segunda dose aos quatro meses (limites de 3 meses e 15 dias até no máximo 7 meses e 29 dias).

A RV5 é produzida pela Merck Vacines® e está disponível somente na rede privada, sendo recomendada em três doses: aos 2, 4 e 6 meses de idade. A primeira dose deve ser administrada no máximo até o terceiro mês e 15 dias de vida; e a terceira dose até sete meses e 29 dias de vida. O intervalo entre as doses deve ser de dois meses, podendo ser de, no mínimo, quatro semanas. Iniciada a vacinação, recomenda-se completar o esquema com a vacina do mesmo laboratório produtor (SBP, 2017).

Dados do MS de 2016-2018, apontaram uma cobertura vacinal abaixo das metas estabelecidas para a VORH, uma vez que os percentuais alcançados ficaram abaixo do preconizado (meta pactuada acima de 95%), como é possível observar na Figura 10. Os resultados para o país como um todo mostraram que a proporção de abandono para a maioria das vacinas do calendário infantil variou entre média e alta no período de 2016-2018. Registra-se o alto índice de abandono para a VORH provavelmente devido ao intervalo de aplicação da 2ª dose entre quatro e sete meses (Figura 10).

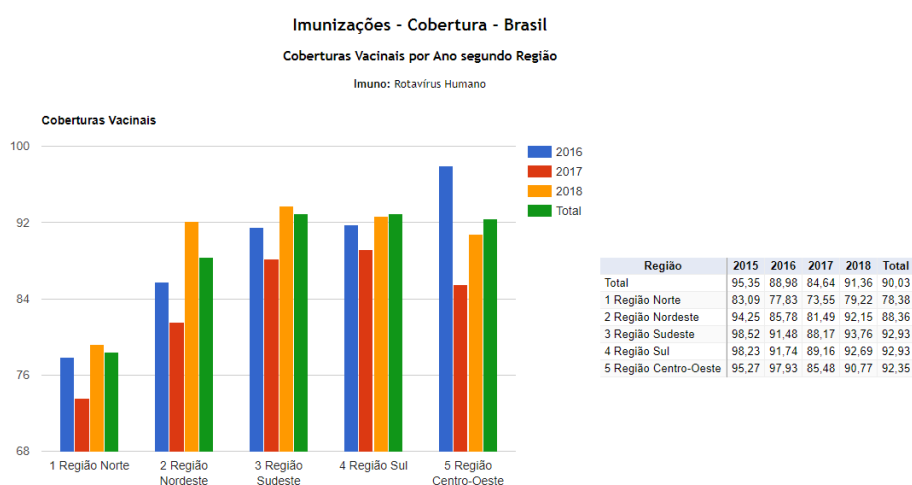


Figura 9 - Resultados da cobertura vacinal da VORH no ano de 2016-2018 para as regiões brasileiras (BRASIL, 2019).

Com relação à cobertura vacinal para a VORH no estado de RR, as Figuras 11 e 12 apresentam os dados por municípios nos anos de 2016 e 2017 disponíveis pelo PNI, mostrando baixas coberturas em Roraima (BRASIL, 2019). As coberturas vacinais para VORH verificadas e apresentadas nas Figuras 10 e 11 (anos de 2016 e 2017) variam, onde em alguns municípios

estão muito abaixo das coberturas mínimas estabelecidas pelo PNI. Baixa cobertura vacinal é um dos fatores para explicar a circulação dos RVA nas populações (Bucardo & Nordgren, 2015). No entanto, poucos estudos até o momento envolvendo amostras de crianças que vivem no estado de RR foram desenvolvidos, sendo objeto deste estudo.

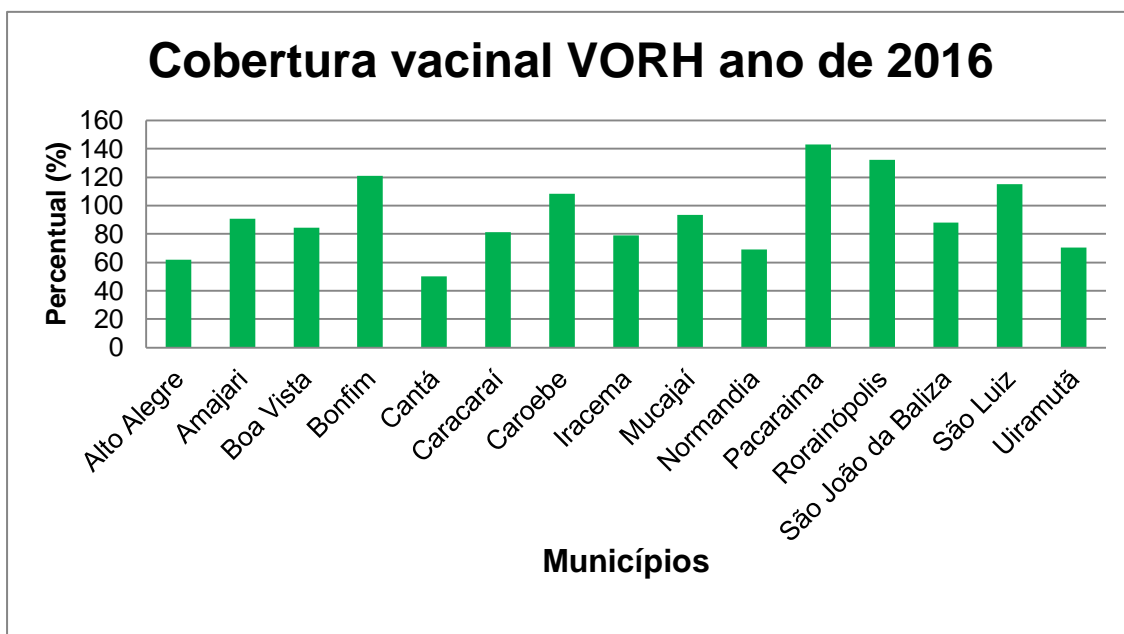


Figura 10 - Resultados da cobertura vacinal da VORH no ano de 2016 para os 15 municípios do estado de Roraima. Os dados foram coletados do informativo do Programa Nacional de Imunizações do Brasil para a confecção do gráfico (BRASIL, 2019).

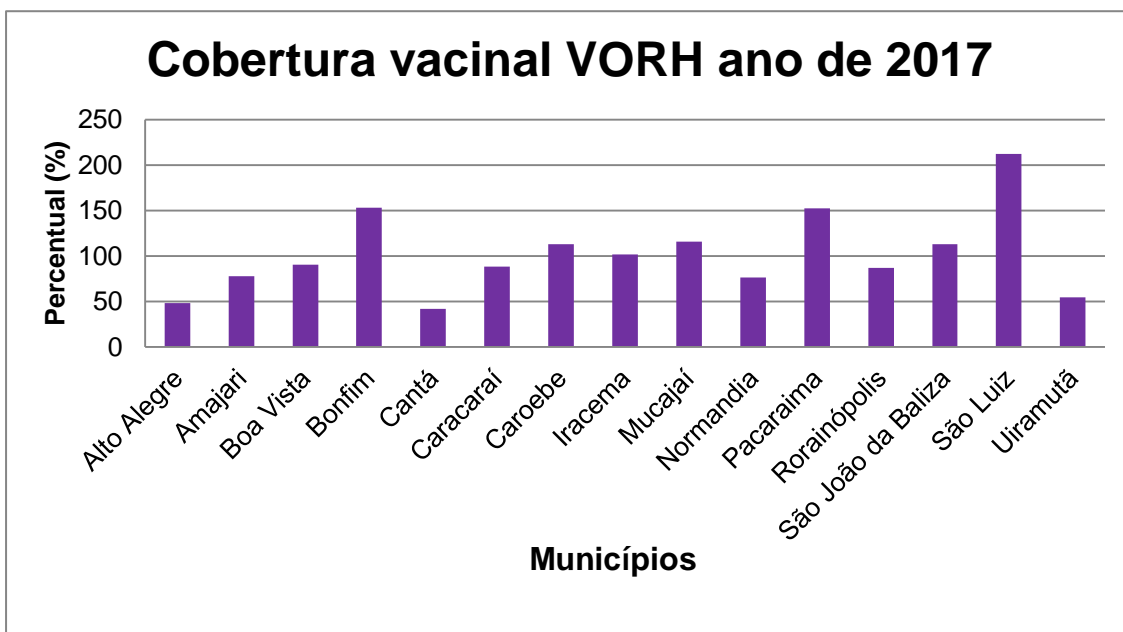


Figura 11 - Resultados da cobertura vacinal da VORH no ano de 2017 para os 15 municípios do estado de Roraima. Os dados foram coletados do informativo do Programa Nacional de Imunizações do Brasil para a confecção do gráfico (BRASIL, 2019).

1.4.1.2. Epidemiologia molecular dos rotavírus A no Brasil

A frequência de detecção dos RVA no Brasil varia de 3,1% a 40%, dependendo da região do Brasil (Santos et al., 2017). Logo após a introdução da vacina RVA pelo PNI em 2006, uma alta proporção de casos de DDA no Brasil foram causados pelo genótipo G2P[4], uma cepa heterotípica para a qual a vacina tem menor eficácia (Gurgel et al. 2009, 2007). Santos e colaboradores (2017) analisaram a proporção de genótipos de RVA relatados em 1436 publicações durante períodos que compreendem os anos de ≤ 1995 a 2015. Os genótipos circulantes neste período no Brasil foram principalmente G1P[8], G2P[4] e G9P[8]. Também foram detectados os genótipos G3P[8], G4P[8], GNT P[6], G2P[6], G1P[6], G3P[6] e G12P[8]. Analisando amostras de fezes de 16.185 crianças representando as cinco regiões do Brasil, com DDA até 12 anos de idade no período de 1996 a 2005 (era pré-vacina RVA) e de 2006 a 2017 (era pós-vacina RVA), Carvalho-Costa e colaboradores (2019) detectaram os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8], G12P[8].

Recentemente Gutierrez e colaboradores (2020) analisaram 1536 amostras de fezes de crianças e adultos com DDA, recebidas no Laboratório

de Referência Regional em Rotavirus-LVCA das regiões Sudeste (estados Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro); Nordeste (estados Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), durante 2018 e 2019. Os genótipos de RVA circulantes detectados foram: G3P[8], G3P[6], G9P[8], G1P[8], G12P[6], G6P[8], G2P[6]. Todos os estudos que envolvem identificação de genótipos circulantes detectam G (VP7) e P(VP4) combinações onde um dos genes são genotipados, o que representa muito bem a diversidade dos RVA circulantes no Brasil.

1.4.1.2.1. A diversidade de genótipos dos rotavírus A circulantes na região Norte do Brasil.

Na era pré-vacinal o primeiro estudo que mostrou a circulação de RVA no Brasil e na região Norte foi o apresentado por Linhares e colaboradores (1981) e a frequência dos RVA foi de 75.6% (127/168) em crianças \leq 5 anos no estado do Pará. Stewien e colaboradores (1991) apresentaram uma frequência de detecção de RVA em crianças \leq 1 de idade de 25% (120/479) no estado do Maranhão.

Na era pós-vacinal foram apresentados vários estudos no Pará (Linhares et al., 2011; Guerra et al., 2015; Costa et al., 2016; Justino et al., 2016), todos mostrando uma frequência entre 16-20% de RVA em crianças \leq 5 anos. Os genótipos observados circulando foram: G1P[8], G2P[4], G9P[8], G12P[8], G12P[9], G3P[8] e G3P[9] (Linhares et al., 2011; Linhares et al., 2011; Gomes et al., 2014; Guerra et al., 2016; Bezerra et al., 2017; Santos et al., 2019).

Existe somente um único estudo apresentado por Soares e colaboradores (2014), em que 258 amostras de fezes, coletadas de crianças \leq 5 anos, provenientes dos estados da região Norte: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e RR, foram avaliadas para a presença dos RVA. O genótipo G2P[4] teve a prevalência de 41% (106/258), sendo também detectados outros genótipos de RVA: G3P[6], G1P[8], G3P[8], G9P[8] e G12P [6]. Neste estudo, apenas 25 amostras foram provenientes de RR, sendo os RVA detectados em

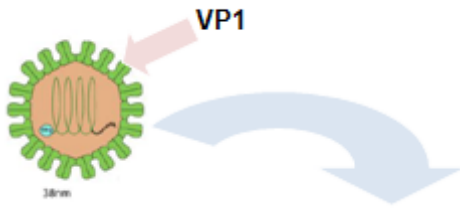
13 das 25 amostras testadas (52%), sendo o genótipo G2P[4] também prevalente.

1.4.2. Os norovírus

A estimativa mundial da frequência de infecção por norovírus é de 18% (Ahmed et al., 2014) e estes agentes etiológicos são a segunda maior causa de DDA em crianças e, atualmente, os patógenos mais importantes quando considerados surtos de DDA em populações humanas em diferentes faixas etárias (Bányai & Estes, 2018; Chhabra et al., 2019). São cada vez mais frequentes surtos causados por norovírus, cuja facilidade de transmissão é superior quando comparados aos RVA, principalmente pelos seguintes motivos: acometem todas as faixas etárias; a transmissão é facilitada em locais confinados, como creches, asilos, escolas e navios, bem como ambientes hospitalares; são muito resistentes às condições ambientais e tendem a permanecer infecciosos por longos períodos em superfícies; a transmissão por veiculação hídrica e alimentos contaminados (frutas, verduras, frutos do mar); ocorrendo a transmissão fecal-oral e até mesmo por vias aéreas, devido aos aerossóis contendo partículas virais presentes nos vômitos; cerca de 30% das pessoas infectadas pelos norovírus são assintomáticas, mas podem transmitir a doença; indivíduos infectados por norovírus continuam transmitindo a infecção por até três semanas, devido à eliminação de partículas infecciosas pelas fezes, mesmo que este indivíduo infectado tenha melhora clínica.

Os norovírus são vírus não envelopados, genoma RNA fita simples linear, de polaridade positiva e pertencem à família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. O genoma viral é organizado em três fases de leitura aberta (Open Reading Frame, ORF). A ORF1 codifica uma poliproteína, que é clivada por uma protease viral em seis proteínas não estruturais (NS1/2-NS7), sendo a NS7 a RNA polimerase RNA dependente (RpRd). As ORFs 2 e 3 originam as proteínas do capsídeo viral (Viral Protein, VP), respectivamente, identificadas como VP1 (maior) e VP2 (menor) (Pogan et al., 2018). A representação esquemática dos norovírus, mostrando a organização genômica e as proteínas não estruturais e virais está apresentada na Figura 13.

1



2

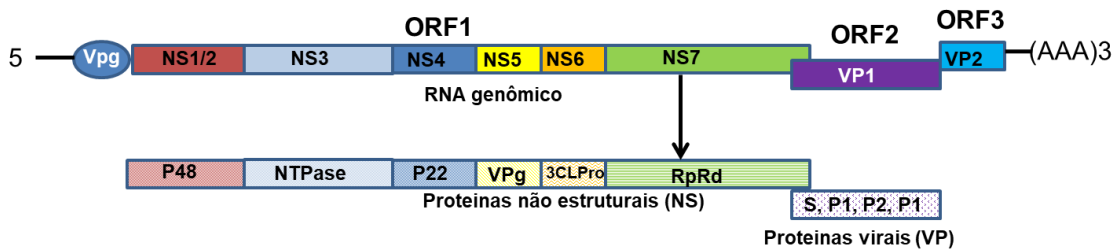


Figura 12 - Partícula dos norovírus humanos mostrando a localização externa das proteínas virais (VP1) (Viralzone, 2016). 2. Esquema representativo da organização genômica e protéica dos norovírus humanos mostrando a localização da porção 3' terminal do sinal de poliadenilação (AAA) e na porção 5' a proteína viral genômica (Vpg). Fase de leitura aberta (Open Reading Frame, ORF).

A classificação dos norovírus (Chhabra et al., 2019) é baseada na sequência de aminoácidos (VP1) de nucleotídeos de toda ORF2 para definição de genogrupos já estabelecidos (GI a GVII). Para os genogrupos novos, fica temporariamente a proposta como GN, até que sejam definitivamente estabelecidos, conforme critério de ocorrência geográfica (Chhabra et al., 2019). Em paralelo a tipagem pelo sequenciamento da NS7 (RpRd) define os grupos e tipos P já estabelecidos ou PN para os novos, usando-se os mesmos critérios do GN, até que sejam definitivamente estabelecidos. Assim, norovírus são atualmente classificados em 10 genogrupos e 49 genótipos (Chhabra et al., 2019). A classificação leva em conta a grande diversidade genética da proteína VP1, e por isso algumas amostras humanas não se encaixam em nenhum dos genótipos descritos até o momento, por isso podem ser subdivididos em variantes. Por exemplo, o genótipo GII.4, que por mutação originou a variante

GII.4 Sydney-2015 e que, por recombinação, na região da RpRd com o GII.P16, tem sido os genótipos/variantes detectados com maior frequência nos casos de DDA mundialmente. Certamente que novos genótipos e variantes irão surgir e serão estabelecidos nas populações, assim como provavelmente novos genogrupos serão identificados em outros animais (Bányai & Estes, 2018; Chhabra et al., 2019; Pogan et al., 2018).

Os norovírus GII são os mais prevalentes em todo o mundo e foi detectado em 81% dos surtos nos EUA em 2017 (<https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data-tables.html#genotype-02>). O genótipo GII.4 é predominante nos casos epidêmicos envolvendo crianças e adultos com quadro de DDA e na última década foi o responsável por 70-80% dos surtos descritos (de Graaf et al., 2016; Glass et al., 2009; Patel et al., 2009; Poló et al., 2016).

Variações genéticas ocorrem no GII.4 fazendo surgir uma variante pandêmica a cada 2 a 3 anos (Gaythorpe et al., 2018). Por outro lado o GII.17, recentemente tornou-se o genótipo predominante em algumas partes da Ásia (Gaythorpe et al., 2018); além disso em 2016 ocorreu na Alemanha a emergência de um novo GII P-16-GII.2 recombinante (de Graaf et al., 2015).

Não existe vacina para a prevenção da infecção pelos norovírus, no entanto estudos de fase III com vacinas genótipos GI/GII (Takeda Pharmaceutical Company Limited) e RVA/VP6 + NoV GI/GII (Vaccine Research Center, University of Tampere Medical School, Finland) estão sendo conduzidos (O'Brien et al., 2019).

Os norovírus são considerados agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e passou a ter vigilância pelo MS em 1999 quanto à ocorrência de surtos, sendo de notificação compulsória de acordo com a Portaria de Consolidação MS-GM nº 4 de 28 de setembro de 2017. A ocorrência deve ser informada no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (Sinan) do SVS/MS (Brasil, 2019). Surtos de DTA ocorrendo em Hospitais/Unidades de saúde do período de 2009 a 2018, foram coletadas com informações de 6.809 notificações, correspondendo a 4,2% dos surtos. Também em 2431 notificações de surtos de DTA no mesmo período, em 3,9%

dos casos o agente etiológico identificado foi o norovírus, correspondendo a 5º agente causador (Brasil, 2019). A Figura 14 apresenta o número de surtos de DTA notificados, durante os anos de 2009 a 2018, por região, onde a região Norte é uma das regiões do Brasil com menor número de notificações de DTA (Brasil, 2019).

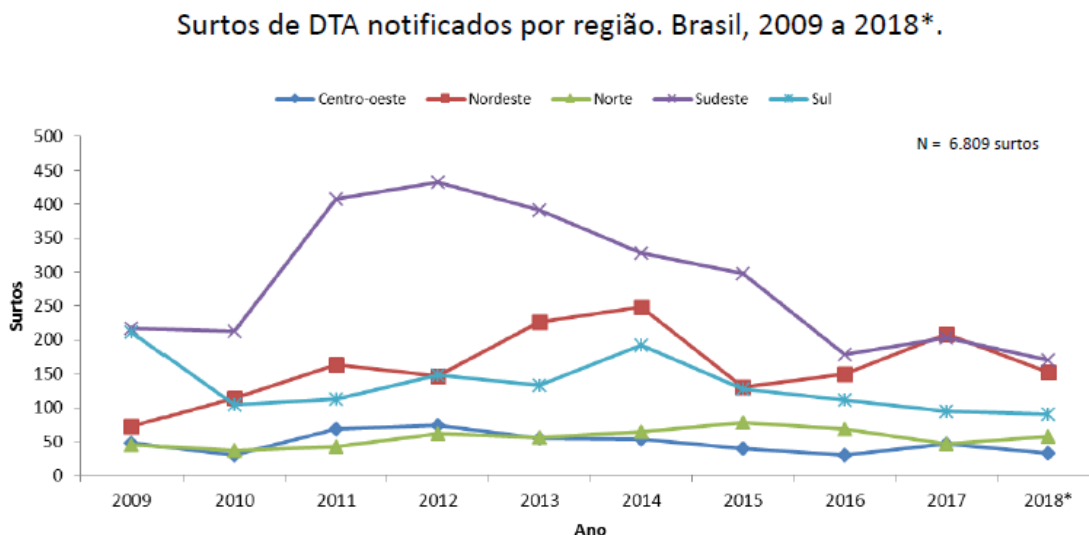


Figura 13 - Perfil epidemiológico por surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) notificados por regiões do Brasil, nos anos de 2009 e 2018. O eixo “y” corresponde ao número de surtos notificados (Brasil, 2019).

1.4.2.1. Epidemiologia molecular dos norovírus e sapovírus no Brasil

Esses agentes virais têm sido detectados em diferentes ambientes, alimentos e em amostras de casos de DDA, a frequência de detecção dos norovírus tem sido revisada e é bastante variável no Brasil (Prado & Miagostovich, 2014; Poló et al. 2016). Em fezes de indivíduos de diferentes idades varia de 2% a 37%, dependendo da região do Brasil (Poló et al. 2016). É descrita uma diversidade de genótipos de norovírus circulantes no Brasil detectados em ambientes, como rios e esgotos, em alimentos e em fezes de indivíduos de todas as idades. Os genótipos detectados são pertencentes aos genogrupos I e II. O genogrupo GIV nunca foi detectado no Brasil, embora tenha sido detectado em um surto na Argentina em 2004 (Gomes et al. 2004). Poló e colaboradores (2016) apresentaram os genótipos de norovírus

circulantes na América do Sul, incluindo o Brasil. Nas amostras de DDA, o genótipo GII.4 tem disso o mais frequentemente detectado. Mas também os genótipos GII.1-4, 6-9, 12-17, 20 e 21. Os genótipos de GI são: GI.1-4 e 6-7. Os principais recombinantes detectados foram GII. P2/GII3, GII. P4/GII.1, GI.P2/GI.6. Em 2016, Barreira e colaboradores detectaram um novo GII.P16/GII.4 circulando no sudeste do Brasil, o qual tem sido atualmente frequentemente detectado em crianças com DDA.

Em 2009 e 2016, respectivamente, Xavier e Portal e seus colaboradores identificaram uma única amostra de SaV (ambas genótipo GII1), nos estados da Bahia e Maranhão, respectivamente, associado a DDA, os quais foram pesquisados em mais de 100 amostras de fezes. Posteriormente alguns estudos foram apresentados, contemplando amostras da região norte do Brasil, que serão apresentados a seguir. Em 2014, Oliveira e colaboradores detectaram SaV em 25 amostras em um total de 539 amostras pesquisadas de crianças de uma creche no estado de Goiás e os genótipos GI.7 e GI.3 foram detectados. Sendo assim, nessas regiões do Brasil a frequência e diversidade detectada até então era baixa. Recentemente, foi reportada uma alta frequência de SaV em Fortaleza em um estudo randomizado realizado pela rede “MAL-ED”, em que a frequência detectada em crianças com DDA foi acima de 20% sendo em média o terceiro agente etiológico em jovens crianças com DDA (The MAL-ED Network Investigators, 2018). Alguns estudos vêm sendo conduzidos com amostras de crianças da região norte do Brasil os quais serão apresentados abaixo.

1.4.2.1.1 A diversidade dos genótipos de norovírus circulantes da região norte do Brasil.

Siqueira e colaboradores (2013a, 2013b) descreveram a circulação dos norovírus estudando amostras de crianças da cidade Belém (Pará), principalmente de até dois anos de idade, negativas para a presença de RVA. A frequência detectada foi em torno de 36% e cerca de 90% das amostras foram genotipadas como GII.4. (Siqueira et al., 2013). A prevalência de GII.4 em comunidades afrodescendentes (quilombolas) residentes no estado do Pará também foi descrita (Aragão et al., 2013).

No Rio Branco, estado do Acre, foi detectada pela primeira vez a variante GII.4 pandêmica (Sydney-2012) descrita por van Beek e colaboradores (2013) em amostras fecais de crianças com menos de oito anos de idade e com DDA (Silva et al., 2013). Em 2017, a variante GII.7 que emergiu na Ásia (Kawasaki-2014-2015) descrita por Martin e colaboradores (2017) também foi identificada na cidade de Belém (Silva et al., 2017).

Estudos com o sequenciamento (método de Sanger) de amostras clínicas positivas para norovírus no Amazonas e amostras ambientais do Pará demonstraram uma grande diversidade de genótipos e variantes de norovírus circulantes, provenientes de crianças e adultos (Hernandez et al., 2016; Costa et al., 2017) e ambientais (Teixeira et al., 2016, 2017).

Siqueira e colaboradores (2017b) revisaram dados de genotipagem dos norovírus circulantes de outubro de 1982 a abril de 2011 em 2520 amostras coletadas de crianças de Belém e obtiveram um perfil da diversidade dos genótipos do gene da polimerase e VP1, sendo: GI.P4, GII.Pa, GII.Pc, GII.Pe, GII.Pg, GII.Pj, GII.P3, GII.P4, GII.P6, GII.P7, GII.P8, GII.P12, GII.P13, GII.P14, GII.P21 e GII.P22 (polimerase); e GI.3, GI.7, GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.7, GII.8, GII.10, GII.12, GII.14, GII.17 e GII.23 (VP1).

Recentemente, das Neves Costa e colaboradores (2019), apresentaram um estudo onde foi sequenciada uma região altamente conservada da proteína VP1 de 12 amostras norovírus positivas e coletadas de crianças com DDA dos estados do Pará e Amazonas nos anos de 2015 e 2016. Todas foram caracterizadas como a variante GII.17 que emergiu na Ásia (Kawasaki-2014-2015), mostrando a circulação recente desta variante nos estados onde foram coletadas as amostras.

Até o momento, não existe nenhum estudo com amostras coletadas de crianças do estado de Roraima que descreva o genótipo circulante nesta região do Brasil.

1.4.3. Sapovírus: família *Caliciviridae*, gênero *Sapovirus*

Após um surto de gastroenterite ocorrido em 1977 na cidade de Sapporo, no Japão, foi identificado por microscopia eletrônica um vírus morfologicamente semelhante ao norovírus, denominado sapovírus (SaV) devido ao nome da cidade onde foi descoberto (Schlenker & Surawicks, 2009). Os SaV, assim como os norovírus, pertencem à família *Caliciviridae*, porém se diferem na epidemiologia e sintomatologia, por exemplo, crianças de dois anos de idade infectadas por norovírus apresentam como sintoma predominante gastroenterite moderada a grave com vômito sendo o sintoma predominante. Já no caso de infecção por SaV, apresentam DDA.

O gênero *Sapovirus* apresenta somente uma espécie e 7 genogrupos (de GI a GVII), sendo GI, GII, GIV e GV são responsáveis por infectar humanos. Estruturalmente possui simetria icosaédrica, com diâmetro de 27 a 40 nm, sendo não envelopados e apresentando RNA fita simples como um representante da mesma família dos norovírus (Desselberger, 2019). Não existem dados de prevalência destes vírus, considerados emergentes no estado de RR; no entanto estudos com amostras da Amazônia (Reymão et al., 2016) mostraram uma diversidade genética nos genótipos detectados (GI.1, GI.2 and GII.2?-GII.4?/GII.4), sugerindo uma possível recombinação entre os genótipos. Recentemente Cilli e colaboradores (2019), sequenciaram todo o genoma de oito SaV (genótipos GI.2 e GI.3) detectados em Belém, estado do Pará.

1.4.4. Astrovírus humanos clássicos e não clássicos

Cerca de 30% das DDA que ocorrem em crianças de 0 a 5 anos não tem etiologia definida. Sendo assim outros agentes virais podem ser os causadores das DDA. Os HAsV são considerados o terceiro agente viral mais comum identificado relacionados as DDA, representando cerca de 10% das DDA não bacterianas (Méndez & Arias, 2013).

Os astrovírus foram descritos por Appleton e Higgins em 1975 (Appleton & Higgins, 1975); que os identificou por ME; no mesmo ano Madeley denominou estes vírus de astrovírus, pela observação de seu formato de

estrela (Madeley & Cosgrove, 1975). Estes vírus apresentam partículas de 28 a 30 nanômetros (nm) de tamanho, são vírus não envelopados e são detectados em amostras de vômitos e diarreia branda em crianças. Estes vírus pertencem a família *Astroviridae* com dois gêneros; *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*, estes últimos infectando diversas espécies de aves. O gênero *Mamastrovirus* é subdividido em “espécies” (MAstV1-19); sendo que a espécie MAstV1 contém os astrovírus humanos (HAstV) genótipos de 1-8, também denominados de “clássicos”. Através da técnica de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing, NGS), novos HAstV “não clássicos” infectando diferentes espécies, inclusive o homem, foram descritos. A diversidade que estes vírus apresentam está relacionada ao potencial zoonótico que os mesmos apresentam (Bosch et al., 2014).

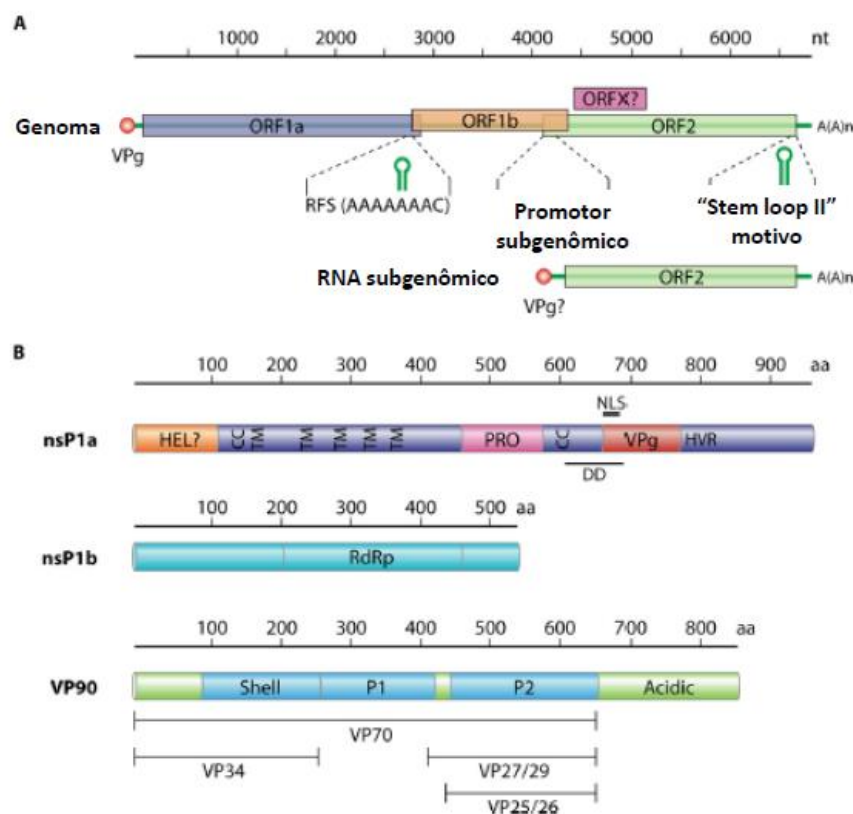


Figura 14 - Representação esquemática da organização genômica e poliproteínas dos astrovírus humanos (HAstV). Fase de leitura aberta (Open Reading Frame, ORF), proteína viral (Viral Protein, VP) e enzima RNA polimerase, RNA dependente-RpRd (RNA dependent RNA polimerase, RdRp) são apresentadas. A figura adaptada de Bosch et al. (2014).

O genoma dos HAstV é do tipo RNA fita simples de polaridade positiva de 6.4 a 7.7kb, dependendo do subtipo e espécie que será apresentado a seguir. O genoma contém uma proteína covalentemente ligada à porção 5' terminal (viral protein genome-linked, VPg). O genoma do HAstV é subdividido em três ORF, sendo ORF1a, ORF1b e ORF2. A tradução destas ORF gera três proteínas principais denominadas de VP90, nsp1a e nsp1bas, conforme representado na Figura 15. Após clivagens essas proteínas geram outras proteínas menores, dentre elas a RdRp (Bosch et al., 2014). A classificação dos HAstV que é baseada na análise filogenética da sequência de aminoácidos (aa) de toda a ORF2 que após a clivagem gera a proteína do capsídeo viral. Mas existe um número relativamente limitado de sequência completas da ORF2, fazendo com que a sequência da RdRp seja também utilizada para a detecção e genotipagem desse vírus (Donato & Vijaykrishna, 2017; Bosch et al., 2014).

Com relação aos HAstV “clássicos”, estudos de vigilância em todo o mundo mostraram que o genótipo 1 é o mais frequentemente detectado em crianças, seguido dos genótipos 2 a 5. Já os genótipos de 6 a 8 raramente são detectados (Donato & Vijaykrishna, 2017). Os HAstV genótipos de 4 e 8 têm sido associados a infecção em crianças mais velhas e com DDA com longa duração (> 7 dias), também o genótipo 4 foi isolado de uma criança com meningoencefalite (Wunderli et al., 2011).

Os HAstV “não clássicos” estão associados a DDA, assim como complicações do sistema nervoso central (SNC) em pacientes imunocomprometidos; estão distribuídos em três espécies: MAstrV6, 8 e 9 conforme detalhado no Quadro 2. Uma extensa revisão sobre estes HAstV foi apresentada por Donato & Vijaykrishna (2017).

Quadro 2 – Astrovírus humanos (HAstrV) “não clássicos” e distribuição nos diferentes gêneros de *Mamastrovirus*.

Espécie de <i>Mamastrovirus</i>	Amostra de astrovírus humano (HAstV)	Deteção inicial
MAstV6	MLB1	Primeiro HAstV “não clássico” detectado na Austrália em 1999 (na cidade de Melbourne, daí o nome

		MLB).
	MLB2	Descrito como novo MLB em 2009, embora já tivesse sido identificado na Índia, porém não classificado como um novo HAstV MLB.
	MLB3	MLB3 foram detectados pela primeira vez na Índia em 2004.
MAstV8	VA/HMO	VA/HMO também foram chamados de VA1 devido a identificação simultânea em 2009, destes HAstV na Virgínia (Estados Unidos) por dois pesquisadores e por geneticamente serem assemelhados aos vírus que infectam ovinos e vison (<i>Human-Mink-Ovine-like</i>)
	VA2/HMO	VA2/HMO foi identificado em 2009 na Índia e no Paquistão.
MAstV9	VA3/HMO-B	VA3/HMO-B foi identificado na Índia em 2009
	VA1/HMO-C	VA1/HMO-C foi identificado na Virgínia em 2009.

1.4.4.1. Epidemiologia molecular dos astrovírus humanos no Brasil

A frequência de detecção dos HAstV clássicos é em média de 7.5% em fezes de crianças com DDA das diferentes regiões do Brasil (Xavier et. al. 2015). Os HAstV foram descritos no Brasil pela primeira vez por Leite e colaboradores (1991) em crianças com DDA no Rio de Janeiro; dez anos depois o genótipo 1 foi detectado em crianças de uma creche também do Rio de Janeiro (Silva et al. 2001). Em Salvador os genótipos 6, 7 e 8 foram identificados (Xavier et al., 2009) e em São Paulo os genótipos de 1-8. (Resque et al. 2007), mostrando que existe uma grande diversidade de genótipos circulantes no Brasil. Xavier e colaboradores (2015) detectaram pela primeira vez o HASV não clássico MLB1 em crianças com DDA no país.

1.4.4.1.1. A diversidade de genótipos dos astrovírus humanos circulantes da região norte do Brasil

Existem poucos trabalhos publicados que apresentam a diversidade genética dos HAstV na região norte do Brasil, embora a circulação de outros agentes virais tenha sido detectada desde 1993 (Pereira et al., 1993). No estado de RR não existe nenhum estudo de detecção de HAstV.

Em um único estudo, Siqueira e colaboradores (2017a), analisando amostras de fezes de crianças com DDA, de 0 a 5 anos da cidade de Belém, verificaram a prevalência dos genótipos de HAstV “clássicos” 1, 2, 3 e 4, detectados mais frequentemente conforme esta ordem. Embora tenha sido verificada a detecção de HAstV “não clássicos” por ensaio da reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR); nenhum genótipo foi detectado.

1.4.5. Bocavírus humanos

Os bocavirus foram identificados por Allander e colaboradores (2005) através de uma técnica que reuniu métodos como tratamento por DNase (enzima que degrada a molécula de DNA), amplificação por oligonucleotídeos randômicos, sequenciamento de alta definição e análise por programas de computadores. Esta técnica foi aplicada a amostras de lavados e swabs obtidos de secreções do trato respiratório de crianças com infecção respiratória aguda (IRA) sem etiologia definida. O percentual de amostras positivas para este então recém-identificado e então denominado bocavirus humanos (HBoV) foi de 3.1%. Sendo então considerados os causadores de IRA. Três adicionais genótipos do HBoV (HBoV2, 3 e 4) com homologia ao inicialmente detectado HBoV1 foram posteriormente identificados em amostras de fezes de crianças, conforme revisado por Guido e colaboradores (2016). Os HBoV são encontrados em associação com outros patógenos, tantos em casos de IRA como em DDA; o que leva a hipótese de que estes vírus não tenham caráter etiológico por si só (Guido et al., 2016). Os HBoV são detectados em outras amostras biológicas como sangue, saliva e urina; assim como no ambiente (Guido et al., 2016).

Os genótipos HBoV1-4 pertencem a família *Parvoviridae*, sub família *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*. São vírus de 18-26nm, não envelopados e com um genoma de DNA fita simples linear (polaridade para DNA positiva ou negativa). O tamanho do genoma é de 5kb, adicionado a 32-52 nucleotídeos de sequência terminal. O genoma do HBoV é organizado em três ORF: ORF1 e ORF2 expressam proteínas não estruturais e ORF3 as proteínas do envelope viral. A Figura 16 apresenta uma representação esquemática da organização genômica dos 4 diferentes genótipos de HBoV com a localização das ORF descritas acima (Guido et al., 2016). A ORF3 é a região utilizada para determinação do genótipo do HBoV (Guido et al., 2016).

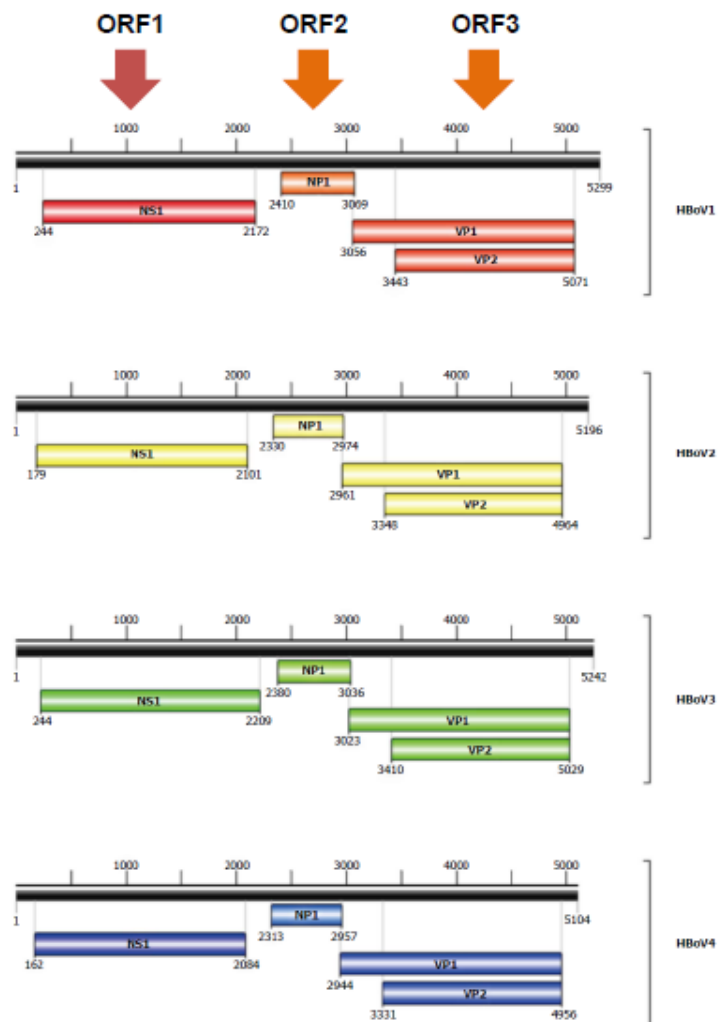


Figura 15 - Representação esquemática da organização genômica e poliproteínas dos bocavírus humanos (HBoV). A fase de leitura aberta (Open Reading Frame, ORF), e proteína viral (Viral Protein, VP) são apresentadas. Adaptada de Guido et al. (2016).

1.4.5.1. Epidemiologia molecular dos bocavírus no Brasil

Os HBoV causam DDA e IRA e a frequência destes vírus no Brasil, depende do genótipo detectado. Desde a sua descrição em 2005 em casos de IRA, a frequência de detecção do genótipo 1 varia de 1,5% a 19%, como no resto do mundo (Guido et al., 2016). Como causadores de DDA, a frequência de detecção do genótipo 3 é bastante baixa, no entanto a do genótipo 2 alcança mais de 20% dependendo da região e de outros fatores como ocorrência de comprometimento imune do indivíduo (Portes et al., 2017; Campos et al., 2016; Santos et al., 2010). O genótipo 2 não é o principal causador de DDA na região norte e será apresentado a seguir.

1.4.5.1.1 A diversidade de genótipos dos bocavírus humanos circulantes da região norte do Brasil.

Dados relativos aos genótipos de HBoV na região norte do Brasil são escassos mas, recentemente Soares e colaboradores (2019) apresentaram um estudo com 225 amostras de fezes de crianças com até 10 anos de idade com DDA e que vivem nos estados do Acre, Amazonas e Pará e RR (somente uma amostra). O genótipo 1 foi prevalente (94.8%). Os genótipos 2 e 3 também detectados, porém em baixas frequências. Em um estudo seguinte Castro e colaboradores (2019), avaliaram amostras de indivíduos que sofreram transplante renal e o genótipo mais frequentemente detectado foi o 3 (95%). Esta tese discutirá os resultados apresentados nos estudo de Leitão e colaboradores (2020), com amostras do estado de RR, e a prevalência de genótipos detectada.

1.4.6. Adenovírus humanos

Os adenovírus foram descritos em 1953 pelo isolamento de células das adenoides e caracterizado, de forma independente por dois grupos (Hilleman & Werner, 1954; Rowe et al., 1953). As infecções causadas por adenovírus humanos (HAdV) causam morbidade e mortalidade em todo o mundo, acometendo pacientes com diferentes características e de todas as idades. São infecções facilmente transmissíveis e em alguns casos, altamente contagiosas. Estes vírus afetam diferentes sítios das mucosas do corpo

humano, incluindo o trato gastrointestinal, respiratório, sistema genit urinário e a superfície ocular. Estão associados com a obesidade e por isso são considerados o patógeno que têm a maior diversidade em afetar o hospedeiro. Sendo perigosos para indivíduos, incluindo pacientes transplantados. O estudo dos HAdV afetou a história da biologia molecular, pois descobriu-se através destes vírus, eventos do ciclo de replicação que foram depois interpretados nas células humanas; o exemplo mais clássico é a existência do mecanismo de *splicing*. Atualmente os HAdV também representam uma ferramenta de utilização em terapia genética e vacinas também (Nemerow & Flint, 2019; Robinson et al., 2013).

Os adenovírus são vírus não envelopados com genoma de fita dupla linear de DNA que pode ser de 26 a 45kb. Possui um formato de capsídeo classicamente icosaédrico de 70 a 100 nm; consistindo de três principais proteínas denominadas de hexon, base do penton e fibra. A partícula viral também é formada por várias proteínas do capsídeo (Robinson et al., 2013). A família *Adenoviridae* está dividida em 5 gêneros: *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* e *Ichtadenovirus*, devido as diferentes espécies e composição de DNA. Os HAdV pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, com 67 sorotipos, subdivididos em 7 espécies de A a G conforme a característica sorológica destes vírus (capacidade de hemaglutinação, potencial oncogênico em roedores e quadro clínico) que também pode ser acessada pelo sequenciamento nucleotídico de parte da proteína do hexon (Ison & Hayden, 2016).

Quadro 3 - Infecções associadas com as diferentes espécies e sorotipos de adenovírus humanos (HAdV) (Ison & Hayden, 2016).

Espécie de HAdV	Sorotipos	Principal tipo de infecção associada
A	12, 18, 31, 61	Doença diarreica aguda (DDA)
B	3,7,11,14,16,21,34-35, 50, 55, 60	Infecção respiratória aguda (IRA) e infecção urinária

C	1, 2, 5-6, 57	IRA
D	8-10, 13, 15, 17, 19-20, 22-30, 32-33, 36-39, 42-49, 51, 53-54, 56, 58-60, 63-67	Infecção ocular,
E	4	IRA
F	40,41	DDA
G	52	DDA

O genoma dos HAdV é transcrito em etapas (fases precoce, intermediária e tardia) em um nível de alta complexidade para produzir as diferentes proteínas que irão compor a estrutura da partícula viral, e também regular a replicação. A Figura 17 é a uma representação esquemática das etapas de transcrição mencionada (Leppard, 2008).

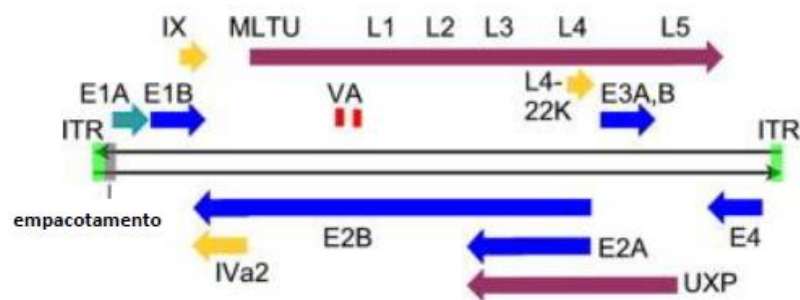


Figura 16- Representação esquemática da organização genômica e RNAs transcritos de acordo com as diferentes fases de transcrição dos HAdV. A letra “E” indica fase precoce (Early), “L”, tardia (Late) e “I” intermediária (Intermediate). Unidade de transcrição tardia (Major Late Transcription Unit, MLTU), região não traduzida (untranslated region, UTR), RNA viral associado (viral associated, VA) e a região para expressão da proteína associada à região exon (U exon protein, UXP), são indicadas (Leppard, 2008).

1.4.6.1. A diversidade de genótipos dos adenovírus humanos circulantes no Brasil.

Os HAdV infectam vários tecidos causando diferentes tipos de infecções. A frequência detectada no Brasil é bastante similar àquela detectada

em outras partes do mundo e anteriormente citada, sendo o terceiro principal causador de IRA. Alguns genótipos são menos frequentemente detectados ou nunca foram detectados no Brasil. A frequência da espécie F causando DDA pode ser alta, pois são agentes que causam surtos epidêmicos em crianças, principalmente até 2 anos de idade, no entanto outras espécies podem também causar surtos de DDA, conforme apresentado por Portes e colaboradores (2016) onde a espécie A foi detectada em quase 90% das amostras. A frequência varia muito de acordo com a região do Brasil. No estado do Espírito Santo, Primo e colaboradores (2018) detectaram uma frequência de 3.3% em um estudo envolvendo 3003 amostras negativas para RVA e norovírus, coletadas de crianças residentes no estado de São Paulo durante os anos de 2012-2017. Por outro lado, no estudo citado anteriormente nesta tese, com amostras de jovens crianças com DDA (The MAL-ED Network Investigators, 2018) os HAdV da espécie F foram identificados como o terceiro principal agente etiológico, junto com os SaV.

1.4.6.1.1. A diversidade de genótipos dos adenovírus humanos circulantes da região norte do Brasil.

A circulação principalmente das espécies F (HAdV40 e 41) e A dos HAdV foi apresentada por Portal e colaboradores (2019); Costa e colaboradores (2017), em crianças de 0 a 5 anos com DDA morando em Belém estado do Pará. A espécie E (HAdV4a) foi detectada circulando em Belém no ano de 1988 também em crianças de 0 a 5 anos, causando IRA (Gomes et al., 1988). Já as espécies B (HAdV3 e 7) e C (HAdV1, 2 e 5) foram detectadas circulando também em Belém, estado do Pará, causando IRA e conjuntivite entre os anos de 1976 a 1995 (Kajon et al., 1999). Quanto ao estado de Roraima não existem dados na literatura da circulação das espécies de HAdV.

1.5. Antígenos do grupo histo sanguíneo

Os antígenos do grupo histo-sanguíneo (Histo blood group antigens, HBGA) são polimórficos, herança individual herdada e considerados marcadores genéticos populacionais (Cooling, 2015). Os polimorfismos podem

aumentar ou diminuir a susceptibilidade às infecções por RVA e norovírus de uma maneira genótipo específica, provavelmente servindo como receptores e co-receptores (Monedero et al., 2018). Além disso, podem afetar a efetividade vacinal, conforme demonstrado recentemente (Colston et al., 2019; Lee et al., 2018; Bucardo et al., 2017; Jiang et al., 2017; Cantelli et al., 2020). O perfil do HBGA também é um fator de susceptibilidade do hospedeiro para várias outras infecções e até doenças, como a diabetes do tipo I (Cooling., 2015; Almand et al., 2017; Ramani et al., 2016). Os HBGA têm como base moléculas de carboidratos. Não são expressos somente nas hemácias; são também expressos em muitos outros tecidos tais como intestino e em secreções do corpo, como na saliva; exceção para fluido cérebro-espinhal (Daniels, 2013). O antígeno H (gene *FUT1*) é um dos antígenos do sistema HBGA sendo fundamental para a expressão do antígeno histo-sanguíneo AB0(H), definindo os grupos sanguíneos. Nos outros tecidos e secreções, na forma solúvel, a expressão do antígeno ABH é feita pelo gene *FUT2* (também chamado de gene Secretor ou “Sec”). Os genes *FUT1* e *FUT2* expressam respectivamente no sangue, em vários tecidos e secreções inicialmente o antígeno H, utilizando uma mesma enzima; a α -1,2-L-fucosiltransferase. Para iniciar a expressão do antígeno H é necessário um precursor do H (Daniels, 2013). O antígeno H é posteriormente processado por duas diferentes glicosiltransferases, codificadas pelo gene ABH (ou AB0). Indivíduos do tipo A produzem uma glicosiltransferase que adiciona um amino-açúcar do tipo N-acetilgalactosamina, formando o antígeno A. Para o tipo B, a enzima adiciona uma molécula de galactose, formando o antígeno B. Se um determinado indivíduo é do tipo sanguíneo AB, o mesmo possui as duas glicosiltransferases diferentes para os dois tipos de açúcares, ativas. Se o gene ABH não codificar nenhuma glicosiltransferase funcional, haverá apenas o antígeno H original e o indivíduo pertence ao grupo “O” (Daniels, 2013; Heggelund et al., 2017; Marionneau et al. 2001). O precursor do antígeno H, antes de ser processado pela enzima α -1,2-L-fucosiltransferase (gene *FUT1*) em H, assim como o ABH secretado pela enzima α -1,2-L-fucosiltransferase (gene *FUT2*) nas formas A, B, AB ou “O”, são adicionados de açúcares pelas enzimas α -1,3/4 fucosiltransferase (gene *FUT3*), respectivamente em Lewis a (também representado como Lea ou Lea+) ou Lewis b (também representando como

Leb ou Leb+) (Almand et al., 2017). O perfil HBGA pode ser definido pela fenotipagem dos HBGA na saliva, classificando um indivíduo em: - Lewis positivos Secretores: ALea-b+, BLea-b+, ABLe a-b+, ou "0Lea-b+; - Lewis negativos Secretores: ALea+b-, BLea+b-, ABLe a+b-, ou "0Lea+b-. Os indivíduos Lewis positivos e não Secretores apresentam o perfil Lea+b- igual aos indivíduos Lewis negativos e Secretores do grupo 0, e por isso a secreção precisa ser confirmada pela detecção da fucose adicionada pela enzima α -1,2-L-fucosiltransferase, codificada pelo gene *FUT2*. Os indivíduos Lewis negativos e não secretores, apresentam o perfil Lea-b-. Estes indivíduos podem ser confirmados como Lea- verificando-se também a secreção da enzima α -1,2-L-fucosiltransferase (gene *FUT2*) que, sendo positiva mostra que provavelmente não ocorre a expressão das enzimas α -1,3/4 fucosiltransferase (gene *FUT3*), capaz de transformar ABH em antígeno Leb+ (Daniels, 2013). As variações do perfil HBGA, tanto na saliva, como no sangue, ou nos dois, são fruto de mutações de base única, que pela frequência nas populações caracterizam-se como polimorfismos de base única (SNP- Single-Nucleotide Polymorphism). Todos os três genes aqui citados (*FUT1*, *FUT2* e *FUT3*) apresentam SNP. Os SNP do gene *FUT1* levam a indivíduos Bombaim e para-Bombaim. O primeiro deficiente do gene *FUT1* foi detectado em 1952, e o fenótipo recebeu o nome de Bombaim devido ter sido detectado na cidade de Bombaim na Índia. Pela classificação de grupo sanguíneo, indivíduos Bombaim são definidos na rotina apresentando a ausência total dos antígenos ABH no sangue e nos tecidos e fluidos corporais como na saliva. O gene *FUT2* tem polimorfismos bastante significantes e com especificidade étnica estabelecida (Almand et al., 2017). Vários estudos foram conduzidos para a caracterização destes SNP, relacionando os mesmos aos diferentes fenótipos das populações mundiais (Ferrer-Admetlla et al., 2009). O principal SNP (rs601338) corresponde à mutação missense 428 G>A, descrita por Kelly e colaboradores (1995), que confere um fenótipo não secretor. Na população ocidental esse é o principal SNP encontrado, determinando que cerca de 20% da população seja não secretora (Ferrer-Admetlla et al., 2009). O SNP rs601338 não é comum na população asiática, que possui preferencialmente o SNP rs1047781, correspondendo à mutação missense 385 A>T (Cooling, 2015). O SNP rs1047781 em homozigose corresponde ao fenótipo denominado fraco

secretor. Fracos secretores expressam baixos níveis da enzima α -1,2-L-fucosiltransferase. No fenótipo fraco secretor, nem todo antígeno Lewis é convertido pelas enzimas α -1,3/4 fucosiltransferase (gene *FUT3*). Como nem todo antígeno H é secretado (por ineficiência da enzima α -1,2-L-fucosiltransferase), testando-se a saliva de indivíduos fracos secretores, o perfil encontrado é $Lea^{+}b^{+}$ (Daniels, 2013). Existe uma série de questões com relação ao perfil fraco secretor. Sabe-se, por exemplo, que o nível de expressão da enzima α -1,2-L-fucosiltransferase, no sangue, em bebês é menor do que em adultos, porém não existem estudos envolvendo amostras de saliva, só apenas de sangue (Roback et al., 2006; Cutubush et al., 1956). Acredita-se que outros diferentes SNP sejam também responsáveis por um perfil fraco secretor (Moraes et al., 2019). O antígeno de Lewis (gene *FUT3*) é adquirido fora das células do sangue, pela ação das enzimas α -1,3/4 fucosiltransferase (1,3 fucosiltransferase ou 1,4 fucosiltransferase), diferente de todos os outros antígenos do HBGA. A enzima α -1,3 fucosiltransferase gera a partir do precursor do antígeno H, pela adição de uma fucose o antígeno Lea^{+} . Este antígeno é do tipo I e não pode ser convertido em Leb^{+} . Para indivíduos secretores a enzima 1,4 fucosiltransferase gera pela via antígeno tipo II, Leb^{+} (Daniels, 2013; Soejima et al., 2006). Os SNP do gene *FUT3* podem levar a inativação das enzimas α -1,3/4 fucosiltransferase. Tais SNP são detectados em indivíduos $Lea^{-}b^{-}$ a um padrão específico de ocorrência e frequência nas populações, assim como descrito acima para o gene *FUT2* (Soejima et al., 2006). Abaixo é apresentada a Figura 18, onde os genes e os antígenos do HBGA são indicados e suas inter-relações (Nordgren & Svensson, 2019).

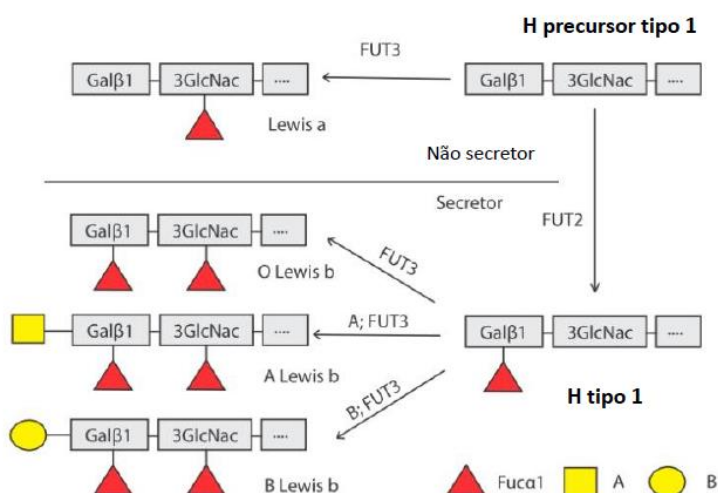


Figura 17 - Representação esquemática da via de biossíntese dos antígenos do grupo histo-sanguíneo, segundo Nordgren & Svensson, 2019, com adaptações. Na figura o tipo 1 = tipo I.

1.5.1. Antígenos do grupo histo-sanguíneo como fator de susceptibilidade as infecções causadas por rotavírus A e norovírus.

Em 2002 foi demonstrado pela primeira vez *in vitro* e com saliva de crianças com HBGA de diferentes perfis Lewis e Secretor, que a VP8* do RVA liga-se ao HBGA (Hu et al., 2012; Huang et al., 2012). Posteriores estudos confirmaram a importância dos antígenos do HBGA do tipo I e também do tipo II. Os RVA genótipos P[4], P[6], and P[8] ligam-se a saliva de indivíduos Lewis e secretores positivos e menos para o grupo B sanguíneo. Os genótipos P[6] ligam-se a saliva de indivíduos Lewis negativo, independente do status secretor. O perfil de ligação para as vacinas RV1 e RV5 segue o mesmo padrão (Sharma et al., 2020).

Os estudos relacionando o HBGA com a infecção por norovírus surgiram a partir de observações quanto a uma “imunidade” adquirida em 50% de militares que participaram de desafio com infecção por norovírus, na década de 1970 (Parrino et al., 1977). Vários estudos comprovaram desde então, conforme revisado por (Nordgren & Svensson, 2019) que o HBGA é um fator de susceptibilidade para a infecção pelos norovírus. Para confirmar, foi

demonstrado que partículas vírus like (virus like particles, VLPs) ligam-se a superfície epitelial da junção gastroduodenal, porém somente em indivíduos secretores positivos e que expressam o antígeno H na saliva e mucosa. O status secretor mediado pelo gene *FUT2* é um mediador de susceptibilidade. Estudos também mostraram que o grupo sanguíneo B oferece proteção parcial para a infecção por norovírus (Nordgren & Svensson, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto das DDA de etiologia viral: rotavírus A, norovírus, sapovírus, astrovírus, bocavírus e adenovírus, correlacionando com os antígenos do grupo histo-sanguíneo, em crianças menores de cinco anos de idade atendidas no Hospital da Criança de Boa vista, Roraima, no período de outubro de 2016 a outubro de 2017.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos e a prevalência de vírus responsáveis pela etiologia das DDA na população de estudo, utilizando como grupo controle crianças na mesma faixa etária e acometidas por IRA;

2.2.2. Avaliar o perfil de cobertura da vacina RVA (RV1) na população de estudo, analisando evidências de efetividade ou não;

2.2.3. Determinar o perfil dos antígenos AB0, secretor e Lewis do HBGA e correlacionar com os vírus detectados na população de estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS.

As metodologias utilizadas e os resultados obtidos neste manuscrito serão apresentados sob a forma de artigos publicados ou em fase de submissão em revistas científicas indexadas.

Capítulo II: Detecção de norovírus, adenovírus, rotavírus e sapovírus e a susceptibilidade mediada pelo perfil dos antígenos do grupo histo-sanguíneo (HBGA), em crianças de 0 a 5 anos da região Amazônica (Brasil, Venezuela e República Federativa da Guiana) (Artigo 1).

Artigo 1: *Gastroenteritis and acute respiratory infections in children from the Amazonian region: rotavirus A, norovirus, adenovirus, sapovirus detection and host histo blood group antigen susceptibility.*

Objetivos específicos relacionados à tese:

2.2.1. Avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos e a prevalência de vírus responsáveis pela etiologia das DDA na população de estudo, utilizando como grupo controle crianças na mesma faixa etária e acometidas por IRA;

2.2.2. Avaliar o perfil de cobertura da vacina RVA (RV1) na população de estudo, analisando evidências de efetividade ou não;

2.2.3. Determinar o perfil dos antígenos AB0, secretor e Lewis do HBGA e correlacionar com os vírus detectados na população de estudo.

Submetido à revista: Journal of Medical Virology

Fator de impacto: 2.021



Gastroenteritis and acute respiratory infections in children from the Amazonian region: rotavirus A, norovirus, adenovirus, sapovirus detection and host histo blood group antigen susceptibility.

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Olivares, Alberto; Oswaldo Cruz Institute, a Laboratory of Comparative and Environmental Virology Leitão, Gabriel; Oswaldo Cruz Institute, a Laboratory of Comparative and Environmental Virology Pimenta, Yan; Oswaldo Cruz Institute, a Laboratory of Comparative and Environmental Virology Cantelli, Carina; Fundacao Oswaldo Cruz, Fumian, Tulio; Oswaldo Cruz Institute, Virology Fialho, Alexandre; Fiocruz, IOC/LVCA Mouta Junior, Sergio; Oswaldo Cruz Institute, a Laboratory of Comparative and Environmental Virology Delgado, Isabella; Fundacao Oswaldo Cruz Nordgren, Johan; Linköping University, Clinical and Experimental Medicine Svensson, Lennart; Medical Faculty, Div of Mol Virology Miagostovich, Marize; Oswaldo Cruz Institute, Virology Moraes, Marcia; Oswaldo Cruz Institute, a Laboratory of Comparative and Environmental Virology Leite, José Paulo; Oswaldo Cruz Institute, Virology</p>
Keywords:	Adenovirus < Virus classification, Human rotavirus < Virus classification, Host range < Infection

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title Page

Alberto Ignácio Olivares Olivares^{a,b}, Gabriel Azevedo Alves Leitão^{a,c}, Yan Cardoso Pimenta^{a,c}, Carina Pacheco Cantelli^d, Tulio Machado Fumian^a, Alexandre Madi Fialho^a, Sergio da Silva e Mouta Junior^a, Isabella Fernandes Delgado^e, Johan Nordgren^e, Lennart Sevansson^e, Marize Pereira Miagostovich^a, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{*,&}, José Paulo Gagliardi Leite^{a*}

Gastroenteritis and acute respiratory infections in children from the Amazonian region: rotavirus A, norovirus, adenovirus, sapovirus detection and host histo blood group antigen susceptibility.

^aLaboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^b Post-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^c Post-Graduate Program in Sanitary Surveillance, National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^d Immunobiological Technology Institute/Bio-Manguinhos, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

^e Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, 581 85 Linköping, Sweden.

* - These authors contributed equally to the manuscript;

& - Corresponding author;

E-mail address of the corresponding author: baroni@ioc.fiocruz.br; marciaterzinha4@gmail.com

ORCID: 0000-0002-7357-9813.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**Text - Research Article***Abstract*

Younger children living in the Amazon region have been struggling with infectious diseases. The AB0, Lewis and secretor histo blood group antigens (HBGA) affect RVA and norovirus host susceptibility in a genotype-dependent manner. In this study, fecal and saliva samples were collected from 734 children with AGE (n= 485) or acute respiratory infection (ARI, n= 249) living in the Amazon region (Brazil, Venezuela and Guyana). The frequencies of RVA, norovirus, sapovirus (SaV) and human adenovirus (HAdV) were verified in feces. HBGA phenotyping and FUT3 genotyping were performed with saliva. The blood group (AB0) types was obtained from each child and Rotarix™ RVA vaccine coverage was estimated. Low RV1 coverage (61%, 448/734) and high HAdV frequencies were observed (AGE 33.6%; 163/485 and ARI 39.7%; 99/249), however norovirus remained the most prevalently detected cause of AGE (38%; 184/485 and ARI 21.3%; 53/249). RVA was the third most prevalent virus causing AGE (22.7%; 110/485 and ARI 19.3%; 48/249). The SaV frequencies were lower (AGE 7.3%; 38/485 and ARI 5.6%; 14/249). Children with ARI who were Lea+b+ and/or blood groups A and 0 presented higher HBGA susceptibility towards acquiring HAdV according to the Odds ratio values. Le (a-b-) children presented the FUT3 genotypes heterogeneous.

Keywords: Human adenovirus, rotavirus A; norovirus; histo-blood group antigens; Rotarix™; Amazon

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Introduction

Infectious diseases are responsible for more than half of childhood deaths and an even greater level of morbidity worldwide. Almost all children infected (99%) live in low-and middle-income countries. Controlling infectious diseases in the Amazon region has been a challenge and frequently this low-income region has suffered, with deforestation being a practice that impacts the health of the younger children living there. Acute gastroenteritis (AGE) and respiratory (ARI) infections correspond to 8% and 12% of these deaths respectively.¹ Rotavirus A (RVA) and norovirus are the most prevalent viral agents causing AGE and sapovirus (SaV) has been considered an emergent AGE causative agent. Human adenovirus (HAdV) is one of the most frequently detected agents in children presenting ARI,² but also frequently causes AGE outbreaks.¹ In 2006, both monovalent (Rotarix™ = RV1) and pentavalent (RotaTeq™ = RV5) vaccines were licensed and recommended by the World Health Organization (WHO) and Pan American Health Organization (PAHO). Six Latin American countries, including Brazil, introduced one of these vaccines into their National Immunization Program (NIP).³ The control of RVA infections showed effectiveness, but due the variability of these viruses the vaccine coverage has to be maintained.³ The AB0 (H), Secretor (*FUT2* gene) and Lewis (*FUT3* gene) Histo-blood group antigens (HBGA) are genetic host susceptibility factors. The different distribution of HBGA phenotypes across the worldwide population might impact RVA vaccine efficacy by altering susceptibility to RVA vaccinations or susceptibility to AGE causing RVA.⁴⁻⁷ HBGAs mediate norovirus and RVA infections in a genotype-dependent manner.⁸ So far, no study involving a representative number of HAdV positive samples in which host HBGA susceptibility was investigated has been presented. The Le (a+ b+), weak secretor (*Se^w*) HBGA was the most detected HBGA phenotype in our previous study where 352 saliva samples from younger children from the Amazon region presenting AGE or ARI were analyzed.⁹ In the present study, the detection frequency of RVA, norovirus, HAdV and SaV was investigated in the feces collected in parallel from these same children,⁹ and also in 382 feces and saliva samples from an additional children recruited. The HBGA phenotype was defined for the remaining 382 saliva samples that were not analyzed previously. Statistical correlation of the frequency of infection with the viruses detected to RV1 vaccination coverage and the HBGA phenotype was performed. In order to explain the high number of children affected by AGE and ARI living in the Amazon region, this study inquired: which was the major viral agent detected causing AGE in the children living in the Amazon region and how the RV1 vaccine

1
2
3 and the HBGA Le (a+b+) profile mainly detected in Amazon region can affect the frequencies of viruses
4
5 here investigated in children with either AGE or ARI.
6
7

8 9 *2. Material and Methods*

10 11 *2.1. Study samples and processing*

12
13 This study was approved by the Federal University of Roraima Ethical Research Committee (CEP No:
14
15 1.333.480 from November 23, 2015). The samples were collected from October 2016 to October 2017. A
16
17 total of 1.468 feces and saliva samples were collected in parallel (corresponding to 734 children \leq 5 years
18
19 old). Saliva samples containing epithelial cell samples were collected at least 1 hour before or after
20
21 breastfeeding. There were 485 children with AGE and 249 with ARI. All children were attended at
22
23 “Hospital da Criança de Santo Antonio” (HCSA) in the city of Boa Vista in the state of Roraima (RR),
24
25 and were living in Brazil, Venezuela and Guyana, including the demarcated indigenous areas from the
26
27 Amazon rainforest. The pediatrician responsible for collecting the samples attended every day at the
28
29 HCSA, checking for children with AGE for collection and checking the seasonality of each virus studied.
30
31 The infants’ ethnic characteristics have been described by Moraes et al.⁹ Sample processing for either
32
33 feces or saliva followed the previously defined protocol.^{9,10}
34

35 36 *2.2. RV1 vaccination data, method of determination of RV1 coverage and blood type data*

37
38 The vaccination card was verified for each child. A vaccination inquiry was performed at HCSA by a
39
40 pediatrician who accompanied this study, questioning each child’s parent or guardians as to the
41
42 vaccination for RVA (double-checking). The vaccination coverage was determined through the method
43
44 recommended by the Ministry of Health in Brazil for the closest record of reality of the local vaccine
45
46 situation.¹¹ The method is named “Monitoring of Vaccination Coverage” (MVC) which is calculated
47
48 considering the total of children vaccinated divided by the total of children in the study (either vaccinated
49
50 or unvaccinated). Blood type data was performed by “Hospital Maternidade de Boa Vista” or
51
52 “Maternidade Nossa Senhora de Nazaré” located in Boa Vista City, RR state. All blood typing was
53
54 performed using monoclonal antibodies according to standardized methods established by the Brazilian
55
56 Health Regulatory Agency (ANVISA).
57

58 59 *2.3. Secretor status and Lewis antigen phenotyping* 60

1
2
3 The HBGA phenotyping was performed via Enzyme Immunoassay (EIA) as previously described.⁹
4
5
6

7 2.4. Nucleotide Sequencing of the *FUT3* (*le*) Gene

8
9 The Le (a-b-) saliva samples (did not react to either mAb anti-Le^a or Le^b) were selected for total genomic
10
11 DNA extraction according to Moraes et al.⁹ Touchdown PCR (TD-PCR) was used to amplify the entire
12
13 coding region of the *FUT3* gene using the Platinum SuperFi DNA Polymerase enzyme according to the
14
15 manufacturer's recommendations (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The *FUT3*
16
17 gene primers were described by Nordgren et al.,¹² for the entire coding region of the *le* gene and for
18
19 covering the five main nucleotide single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *le* gene,¹³⁻¹⁵:
20
21 rs28362459 (59T>G); rs812936 (202T>C); rs778986 (314 C>T); rs3745635 (508G>A) and rs3894326
22
23 (1067T>G). The amplicons were purified using Wizard PCR Prep Columns according to the
24
25 manufacturer's recommendations (Promega, Wisconsin, USA) and sequenced using all the eight primers
26
27 described by Nordgren et al.¹² on the ABI Prism BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Ready
28
29 Reaction Kit and ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems, California, USA).
30
31

32 2.5. Sequence Analysis

33
34 The chromatograms of the *FUT3* gene coding nucleotide sequences were analyzed using the free tracer
35
36 viewer Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia). *FUT3* gene nucleotide and
37
38 amino acid multiple alignment sequencing was done using the Mega -Molecular Evolutionary Genetic
39
40 Analysis Version X (ten) software. The NM_000149 reference sequence was described by Elmgre et al.,¹⁴
41
42 obtained from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The
43
44 *FUT3* gene SNPs identified so far were accessed through the NCBI database of SNPs
45
46 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).
47
48

49 2.6. Rotavirus A, GI/GII norovirus and human adenovirus detection in feces

50
51 Monoplex or duplex reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) respectively
52
53 for detection of RVA or GI/GII norovirus, was performed as previously described.¹⁶⁻¹⁷ A duplex
54
55 quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was established and formatted for detection of
56
57 HAdV and human bocavirus (HBoV) as recently presented.¹⁸
58
59
60

2.7. Sapovirus reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) detection in feces

A RT-qPCR was established and formatted for detection of SaV, based on a previously developed method for this virus with primers and probes (FAM-labeled) as previously described.^{19,20} The method was first tested using samples already previously defined as SaV, standard curves and the non-template controls (NTC), available in the Regional Rotavirus Reference Laboratory -Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LVCA) all in duplicates. The specificity of the test was verified comparing the positivity and the cycle threshold (C_t) values obtained with those already known for the samples tested.¹⁹ The SaV NTC is named as CI-028 (C_t value 18.00). The sensitivity of qRT-PCR was defined using double-stranded (ds) DNA fragments (gBlock® Gene Fragment, Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) designed containing the SaV target region amplified by the primers, based on the SaV genome (RNA dependent RNA polimease-capsid junction region of Open Reading Frame 1, ORF1). A 10-fold serial dilution of gBlock® was used to generate a standard curve between log standard concentrations. The reactions were conducted using the SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's recommendations in a total volume of 20µL and with optimized thermal cycling conditions as follows: an enzyme activation step at 95 °C for 15 min, 45 cycles of PCR amplification at 94 °C for 1 min, and at 60 °C for 1 min. All qPCR reactions were conducted on the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California USA). Samples that showed signals crossing the threshold line in both replicas up to a C_t value of 40.00, and presented a characteristic sigmoid curve, were regarded as positive.

2.8. Statistical Analysis of Data

The Statistica 12.6 software (December, 2014) was used for all statistical analysis. The statistical tests were Pearson Chi-Square (Differences were considered statistically significant at p value greater than 0.05).²¹ Odds ratio (OR) values were calculated according to Szumilas.²²

3. Results

3.1. Cycle threshold (C_t) values detected to investigated RVA, norovirus, human adenovirus and sapovirus in feces of children with either AGE or ARI

The median C_t value detected by qRT-PCR for norovirus was 20.2 for the AGE group and 20.5 for the ARI group, with standard deviations (SD) of 2.6 and 3.0 respectively. Similar C_t values were detected in

1
2
3 both the AGE and ARI groups for RVA. The median C_t values for HAdV were 37.2 (AGE group) and
4
5 35.6 (ARI group) with SD of 5.5 and 6.4 respectively. SaV median C_t values were 30.3 (SD, 7.4) and 27.4
6
7 (SD, 6.4), for the AGE and ARI groups respectively.
8
9

10
11 *3.2. High frequencies of human rotavirus A, norovirus, adenovirus and less of sapovirus detected in*
12
13 *children both presenting AGE or ARI and living in the Amazon Region.*

14
15 The children were all from the Amazon region as previously described,⁹ and were aged from 1 to 5 years
16
17 old, 90% of which were living in the state of RR (660/734), these being 430 (58.6%) boys and 304
18
19 (41.4%) girls. High frequencies of RVA, norovirus (genogroup II-GII) and HAdV were detected in feces
20
21 of children with AGE or ARI. The frequencies were highest for norovirus in children with AGE (38%,
22
23 184/485) and for HAdV in children with ARI (39.7%, 99/249). The frequency of HAdV detected in
24
25 children with AGE (33.6%, 163/485), was almost similar to the norovirus frequency and was higher than
26
27 what was detected for RVA (22.7%, 110/485). In children with ARI the frequencies detected for
28
29 norovirus and RVA were similar, at 19.3% (48/249) and 21.3% (53/249), respectively. The frequency of
30
31 detection of RVA in both the RV1 vaccinated and unvaccinated groups of children was similar for the
32
33 group of children presenting AGE ($p = 0.09$) and the group presenting ARI ($p = 0.07$). These frequencies
34
35 were between 13.9 and 25.3%. SaV detected frequencies were low for the AGE group of children (7.3,
36
37 38/485), but higher than the ARI group (5.6%, 14/249). The norovirus GII was predominant (92.4%,
38
39 219/237). The infection frequency of norovirus GI and GI+GII was 2% and 4%, respectively (data not
40
41 shown). [Figure 1](#) presents frequencies of RVA, norovirus, HAdV and SaV by Amazon region
42
43 (municipality, state or country), detected in the feces of the children enrolled in this study with AGE or
44
45 ARI. Children living in the municipality of Boa Vista, Alto Alegre, Uiramutã in RR state, and children
46
47 living in Venezuela were attended at HCSA in greater number in comparison with other municipalities or
48
49 with Guyana, and the infection by RVA, norovirus and HAdV was detected mostly in children from these
50
51 areas. HAdV was detected in higher number in regions with children with both AGE and ARI and at
52
53 frequencies similar to norovirus in children with AGE. In children with ARI, both RVA and norovirus
54
55 were less detected. [Figure 2](#) shows the seasonality profile for each virus detected in this study from fecal
56
57 samples of children living in the Amazon region and presenting AGE. For all viruses detected in this
58
59 study, the months with the highest incidence were March, April and May (April being the one with the
60
highest incidence) all within the period of driest weather in the Amazon region (low water season). May

1
2
3 and July were the months with the highest incidence of norovirus infection, being dry (low water season)
4 and rainy (wet season) months, respectively, in the Amazonian region, according to the Brazilian National
5 Institute for Space Research (INPE).
6
7

10 3.3. The Monitoring of Vaccination Coverage Method Indicated a Low Rotarix™ (RV1) Vaccination

12 Coverage in the Amazon Region

14 The RV1 was the vaccine received by all vaccinated young children enrolled in this study (which is given
15 in two doses at 2 and 4 months of age). The percentage of children that received one dose was 21.1%
16 (155/734) and two doses, 40% (293/734). Thirty-nine percent (286/734) of children in this study had not
17 received the RV1 vaccine. The RV1 vaccination coverage calculated was 61% (448/734) and ranged from
18 21.4% in the state of Amazonas (AM-Brazil) to 100% in the São Luiz municipality. According to [Figure](#)
19 [3A](#), the municipalities of Amajari, Normandia and Alto Alegre (Amazon rainforest reserve) presented
20 RV1 vaccination coverages below 50%. RV1 vaccination coverage in children from Venezuela and
21 Amazonas (AM-Brazil) was also very low, below 30%. The RV1 vaccination coverages in the other
22 municipalities had an average of 60% to 75%. The profile of RVA in vaccinated and unvaccinated
23 children was evaluated ([Figure 3B](#)). Vaccinated children presenting AGE with ages between 6 month and
24 1 year old had higher frequencies for RVA infection. High RVA frequency was also detected in
25 unvaccinated children presenting AGE ≤ 3 -months old. Lower or similar frequencies of RVA infection
26 were detected in all children with ARI, both vaccinated and unvaccinated; with an exception for
27 unvaccinated children ≤ 3 months old.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 3.4. ABO, Lewis and secretor Histo-Blood Group Antigens Secretor and Lewis Status Could Impact the

45 Frequency of human adenovirus

46 The weak secretor (Lea+b+) phenotype was predominant at 54.5% (400/734). Children from the
47 Amazonian region also presented secretor Lea-b+ (24.9%, 183/734), non-secretor Lea-b+ (6.1%, 45/734)
48 and non-secretor Lea-b- (14.4%, 106/734) phenotypes. The children were grouped according to the virus
49 detected in this study (Table 1). The weak secretor children were preferably infected by all viruses
50 detected, then secretors and non-secretors (Lea-b-). Non-secretor Lea+Leb- children were the least
51 infected by all viruses (Table 1). Table 2 summarized the results of ABO HBGA where the children were
52 grouped according to the virus detected. The odds ratio (OR) and confidence interval (CI) were calculated
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and significance values were obtained for infection with HAdV when children were blood group A or O.
4
5 Children belonging blood group O presented high risk of acquiring HAdV (0.88 OR, 0.55 CI) and
6
7 developing ARI.
8
9

10 3.5. Diversity of *FUT3* Genotype Detected in Children from the Amazon Region

11
12 DNA samples of 43.4% (42/106) of Le (a-b-) children were successively amplified from saliva and the
13
14 occurrence of the five main SNPs of the *le* gene was investigated. New mutations adjacent to these were
15
16 also detected. The 59T>G and 508G>A SNPs were detected in high frequency, 50% (21/42) and 76.2%
17
18 (32/42) respectively, as well as the rs139326855 (858A>G) SNP,²³ and the new mutation 1011C>G, both
19
20 in 31% (13/42) of children. The 202T>C, 1067T>G SNPs and the rs28362463 (484G>A) SNP (Nordgren
21
22 et al., 2014) were also detected, at a lower frequency, in 4.8% (2/42) of children, with the new mutations
23
24 being: 34C>T and 870C>A, 7.1% (3/42); 251T>A and 292A>T, 14.3% (6/42); 254T>G, 9.5% (4/42);
25
26 305A>T, 16.7% (7/42); 512G<A, 4.8%; 509G>A, 12% (5/42) (Figure 4).
27
28
29

30 4. Discussion

31
32 The overall virus frequencies detected in our study were similar between the AGE and ARI control
33
34 groups, involving 734 children from the Amazon region, with an exception for the norovirus frequency
35
36 detected in the AGE group (38%), almost the double of that in the ARI group (21.3%). The estimated
37
38 global norovirus frequency is 18%.³ In the Amazon region, it has varied from 7.8% up to 35.2% in young
39
40 children.²⁴⁻²⁶ Norovirus is the most common cause of diarrheal episodes globally.²⁷ and the high
41
42 frequency also detected in ARI group probably is a result of genetic susceptibility of children from this
43
44 study that are mostly weak secretors as previously identified.⁹ The host susceptibility to norovirus affects
45
46 the norovirus infection and non-secretors, having an inactivated *FUT2* enzyme, do not express blood
47
48 group antigens and are resistant to several norovirus genotypes, including the predominant GII.4.⁹ There
49
50 is a big issue to be clarified after norovirus genotyping. We are further investigating to understand how
51
52 the weak secretor Amazonian children respond to the norovirus infection. Concerning the RVA, the most
53
54 important fact is that the low RV1 vaccination coverage is probably maintaining high frequencies of RVA
55
56 in both groups because ≤ 3 -month aged unvaccinated children were found to be a highly RVA infected
57
58 AGE group. Branco et al.,²⁸ reported a low RV1 vaccination coverage in the state of Acre in 2014, eight
59
60 years after the introduction of RV1 via the NIP. It might be necessary to these regions, to study

1
2
3 immunization strategies to 1-month old children, as most children are brought from the Amazon
4 rainforest to HCSA with great difficulty. However, vaccinated children were the most RVA infected.
5
6 Additionally, vaccinated children between 6 months and 2 years of age presenting AGE were highly
7 infected by RVA. Besides the low vaccination coverage, factors such as RVA diversity and the high
8 frequency of secretor children could also be impactful and should be investigated. There is only one study
9 with children with AGE from RR, ²⁹ with 25 fecal samples evaluated and an RVA detection rate of 52%
10 (13/25). Similar studies have reported an overall frequency of up to 20% RVA in the Brazilian Amazon
11 children but higher frequencies are also found as reported in Acre (46%), Amazonas (28.5%), Amapá
12 (38%), Pará (26.3), Rondônia (71.4%) and Roraima (52%). ^{30,31} The health teams have trouble accessing
13 the regions where the children live; making the vaccination process very difficult. The Amazon is a
14 region of great challenges, due to the difficulty of access (Amazon rainforest) and the state of Roraima
15 being where most children of this study live, composed of regions of demarcated indigenous areas with
16 their own culture.
17
18 HAdVs are ubiquitous pathogens depending on the type/species and display various tropisms that
19 correlate with clinical manifestations and typically infect the respiratory, digestive and ocular tracts.
20
21 HAdV is one of the most frequently detected agents in children presenting ARI. ² The enteric HAdV-F
22 (types 40 and 41) accounted for more than 20% of diarrhea cases. ³²⁻³⁴ HAdV was the second main
23 etiologic agent of AGE in a case-control study. ^{32, 35, 34} The available data regarding incidence in Brazil is
24 limited, especially in diarrheic diseases in the post rotavirus (RVA) vaccine era. Portal et al., ³⁶ reported
25 HAdV positivity of 50.2% (110/219) in fecal samples collected from March 2012 to April 2015 from
26 children hospitalized for AGE attended in two large pediatric hospitals in the Amazon region. HAdV was
27 also detected in this study in high frequencies in both AGE and ARI groups. HAdV was the most
28 frequently detected in children living in different municipalities of RR and Amazonas states (Brazil), also
29 in the countries of Venezuela and Guyana. HAdV frequency in AGE children was almost similar to
30 norovirus, showing the important contribution of HAdV for AGE.
31
32 In this study, SaV, norovirus and HAdV infection frequencies are reported for the first time in RR state.
33
34 Samples collected from children living in RR including demarcated indigenous areas from the Amazon
35 rainforest corresponded to 91.1% (669/734) of total. Low SaV frequencies were detected in this study
36 (7.3%, 38/485) in fecal samples from children with AGE under 5 years old, living in the Amazon region.
37
38 Costa et al., ³⁷ have detected even lower values (5.2%, 9/172). Frequencies detected in Boa Vista (RR
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 capital) and Venezuela were higher but non-significant when compared to AGE and ARI group (control)
4 values. In the 2016 sample collection, there was a huge increase in the number of children attended in
5 HCSA from the country of Venezuela, which may have influenced the virus detection here presented.
6
7 An interesting fact is concerning the seasonality that was verified for each virus detected in this study.
8
9 The dry season is the period occurring in the Amazon region where the children are more affected by
10 AGE caused by all viruses; however, a peak of high norovirus infection frequency was observed in July
11 (wet season). High norovirus frequencies in the wet season in the Amazon region have been reported by
12 Vieira et al.³⁸ Probably the particular climate of the Amazon region has had an impact on AGE caused by
13 norovirus occurring in Amazonian children.
14
15 We verified the Ct values detected by RT-qPCR for all viruses identified in this study. Trang et al.³⁹
16 estimated that a Ct < 21.36 could be assumed to represent cases for which norovirus was the causal agent
17 of diarrhea. Phillips et al.,⁴⁰ assumed that Ct values up to 31.0 could be considered as criteria (cut off) to
18 select norovirus positive samples. Even assuming a Ct cut off criterion of 31.0, for norovirus there were
19 more Ct values under the cut off in ARI children, with 67.9%, against 51.6% in AGE children. As such,
20 this cut off criterion for norovirus detection rate should be better investigated considering the Ct value of
21 20.2 detected in 43.4% of norovirus positive AGE children's feces. Fuller et al.,⁴¹ established an
22 association between low Ct values and severity of ARI caused by the influenza virus and respiratory
23 syncytial virus (RSV) in children under 5 years old. In our study, RVA, HAdV and SaV presented high
24 similar Ct RT-qPCR values in the AGE and ARI groups.
25
26 Many groups have investigated the relationship between AB0-HBGA and susceptibility to certain
27 diseases including SARS-CoV-2.⁴² The validity of the conclusions is dependent on the application of
28 appropriate statistical analysis. The frequency of blood group "O" in children from the Amazon region
29 enrolled in this study was high and even so, too significant values of CI were detected to consider either
30 blood groups children belong to, "A" or "O", as more susceptible to acquiring HAdV. Our result is in
31 agreement with the two studies published in the sixties that correlated blood group susceptibility factor
32 with ARI.^{43,44} The host Lewis and secretor HBGA factor influences the susceptibility to RVA and
33 norovirus infections.^{5,8} In this study, RVA, norovirus and HAdV circulating in the Amazonian children
34 were infecting mainly Le (a+b+) and Le (a-b+) children. Children with a Le (a+b-) profile had very low
35 frequencies of either RVA or norovirus infections, reinforcing the protective factor of this HBGA Lewis
36 phenotype as previously reviewed.^{5,8} In this study, the Le (a+b-) phenotype protective factor was also
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 verified for HAdV infection. In order to confirm the 0Le (a-b-) phenotype as non-secretor, 42
4
5 DNAs/*FUT3* nucleotide gene sequence from Amazonian children was accessed. We verified the presence
6
7 of the five main SNPs of the *FUT3* gene in Le (a-b-) children via nucleotide sequencing of DNA from
8
9 saliva, and adjacent to the five main SNPs nine new mutations were detected. These new mutations could
10
11 explain the Le (a-b-) phenotype, especially the 1011C>G mutation, because of its high frequency and
12
13 because one child phenotyped as Le (a-b-) has only this mutation. Further studies should be necessary
14
15 including the sequencing of non-Le (a-b-) control samples. The most common haplotype SNPs
16
17 correspond to the *le*^{59/508}, which have been detected in Asian (24%) and African (19%) populations, while
18
19 the *le*^{202/314} (17%) and *le*^{59/1067} (4%) were found mainly in European populations.¹³ The rs3745635
20
21 (508G>A), and rs3894326 (1067T>A) SNPs, which are both detected in the catalytic domain of the
22
23 enzyme, inactivate the product of the *le* gene, while the rs28362459 (59T>G) SNP, in the trans-
24
25 membranous domain of this protein, only reduces its enzymatic activity rather than eliminating it
26
27 altogether.^{13, 15} The profile of *le* gene SNPs from children from the Amazon region detected was mainly
28
29 the haplotype *le*^{59/508}, showing some genetic proximity between native Asian and Amazonian individuals
30
31 as previously reported.⁹

32 33 34 *Funding*

35
36 We are grateful for support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel
37
38 (CAPES) “Programa de Professor Visitante no Exterior-Edital no.01/2019-Processo 88881.337140/2019-
39
40 01”; The National Council for Scientific and Technological Development–CNPq number424376/2016-4;
41
42 Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro-FAPERJ “Edital Carlos Chagas Filho”
43
44 and Oswaldo Cruz Institute-IOC (PAEF).

45 46 47 *Conflict of interest*

48
49 The authors declare there is no conflict of interest.

50 51 52 53 *Acknowledgements*

54
55 The authors acknowledge all children and their parents for making this study possible. Thanks to
56
57 Professor Dr. José Francisco Luitgards Moura from UFRR, for all his support throughout the Project and
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

for his teachings on indigenous culture. To Bruno Baroni de Moraes e Souza for the English revision. The authors are very grateful to Waldemar da Silva Souza for his assistance with the Statistica 12.6 software.

References

1. GBD 2015 LRI Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17:1133-1161.
2. Frenkel LD. Infectious diseases as a cause of global childhood mortality and morbidity: Progress in recognition, prevention, and treatment. *Adv Pediatr Res.* 2018; 5:14.
3. PATH. Rotavirus vaccine access and delivery. PATH. Available from: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/country-introductionmaps-and-spreadsheet/>. 2015.
4. Cantelli CP, Velloso AJ, Assis RMS, et al. Rotavirus A shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2018. *Sci Rep.* 2020; 10:6965.
5. Sharma S, Hagbom M, Svensson L, Nordgren J. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take. *Viruses.* 2020; 12:pii: E324.
6. Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Kregel U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Curr Opin Struct Biol.* 2017; 44:190-200.
7. Desselberger U. Differences of Rotavirus Vaccine Effectiveness by Country: Likely Causes and Contributing Factors. *Pathogens.* 2017; 6:65.
8. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses.* 2019; 11:pii, E226.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

9. Moraes MTB, Olivares AIO, Fialho AM, 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: 6-66.
10. Carvalho-Costa FA, de Assis RMS, Fialho AM, et al. The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. *BMC Pediatr.* 2019; 19:42.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização. Protocolo de Monitoramento Rápido de Cobertura (MRC) em menores crianças < 5 anos de idade (6 meses e 4a 11 meses 29 dias) pós campanha de multivacinação, Brasil, 2012. 2012; Brasília (DF): MS.
12. Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpo J, Svensson L. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69557.
13. Soejima M, Koda Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med.* 2005; 7:266-9.
14. Elmgren A, Börjeson C, Svensson L, Rydberg L, Larson G. DNA sequencing and screening for point mutations in the human Lewis (FUT3) gene enables molecular genotyping of the human Lewis blood group system. *Vox Sang* 1996; 70:97-103.
15. Mollicone R, Reguigne I, Kelly RJ, et al. Molecular basis for Lewis alpha(1,3/1,4)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT3) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. *J Biol Chem.* 1994; 269:20987-94.
16. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008; 153:238-40.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

17. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1548-57.
18. Leitão GAA, Olivares AIO, Pimenta YC, et al. Human Bocavirus genotypes 1 and 2 detected in younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections, respectively. *Int J Infect Dis.* 2020; 95:32-37.
19. Fioretti JM, Rocha MS, Fumian TM, et al. Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol.* 2016; 121:855-862.
20. Oka T, Katayama K, Hansman GS, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006; 78, 1347–1353.
21. Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos. Mag. Series 5.* 1900; 50:157-75.
22. Szumilas M. Explaining odds ratios as conditional risk ratios. *J Clin Epidemiol.* 2018; 97:122-25.
23. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin Infect Dis.* 2014; 59:1567-73.
24. Bitencurt ELR, Siqueira JAM, Medeiros TB, et al. Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. *J Med Virol.* 2019; 91:997-1007.
25. Costa STPD, Fumian TM, Lima ICG, et al. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112:391-5.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

26. Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110:215-21.

27. Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD, Parashar UD. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med.* 2016; 26:13(4):e1001999.

28. Branco FLCC, Pereira TM, Delfino BM, et al. Socioeconomic inequalities are still a barrier to full child vaccine coverage in the Brazilian Amazon: a cross-sectional study in Assis Brasil, Acre, Brazil. *Int J Equity Health.* 2014; 13: 118.

29. Soares LS, Guerra SFS, Oliveira ASL, et al. Diversity of Rotavirus Strains Circulating in Northern Brazil After Introduction of a Rotavirus Vaccine: High Prevalence of G3P [6] Genotype. *J Med Virol.* 2014; 86:1065-72.

30. Neves MA, Pinheiro HH, Silva RS, et al. High prevalence of G12P [8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. *J Med Virol.* 2016; 88:782-9.

31. Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39:507-17.

32. Iturriza-Gómara M, Jere KC, Hungerford D, et al. Etiology of Diarrhea Among Hospitalized Children in Blantyre, Malawi, Following Rotavirus Vaccine Introduction: A Case-Control Study. *J Infect Dis.* 2019; 220:213-18.

33. Qiu FZ, Shen XX, Li GX, et al. Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study 2. *BMC Infect Dis.* 2018; 18:450.

- 1
2
3 34. Liu L, Qian Y, Zhang Y. et al. Adenoviruses associated with acute diarrhea in children in Beijing,
4
5 China. Plos One. 2014; 9(2):e88791.
6
7
8
9 35. Liu J, Platts-Mills JA, Juma J, et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify
10
11 causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. Lancet. 2016; 24:
12
13 388(10051), 1291–1301.
14
15
16 36. Portal TM, Reymão TKA, Neto GAQ, et al. Detection and genotyping of enteric viruses in
17
18 hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil: Occurrence of adenovirus viremia by
19
20 species F, types 40/41. J Med Virol. 2019; 91:378-384.
21
22
23 37. Costa LCPN, Siqueira JAM, Portal TM, et al. Detection and genotyping of human adenovirus and
24
25 sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: first detection of
26
27 GI.7 and GV.2 sapoviruses in Brazil. Rev Soc Med Trop. 2017; 50: 621-28.
28
29
30
31 38. Vieira CB, Correa AA, de Jesus MS, et al. The Impact of the Extreme Amazonian Flood Season on
32
33 the Incidence of Viral Gastroenteritis Cases. Food Environ Virol. 2017; 9:195–207.
34
35
36
37 39. Trang, NV, Choisy M, Nakagomi T, et al. Determination of cut-off cycle threshold values in routine
38
39 RT-PCR assays to assist differential diagnosis of norovirus in children hospitalized for acute
40
41 gastroenteritis. Epidemiol Infect. 2015; 143: 3292-9.
42
43
44
45 40. Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing norovirus-
46
47 associated infectious intestinal disease using viral load. BMC Infect Dis. 2009; 9:63.
48
49
50
51 41. Fuller JA, Njenga MK, Bigogo G, et al. Association of the CT values of real-time PCR of viral upper
52
53 respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. J Med Virol. 2013; 85:924-32.
54
55
56
57 42. Severe Covid-19 GWAS Group. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with
58
59 Respiratory Failure. N Engl J Med. 2020; 17:NEJMoa2020283.
60

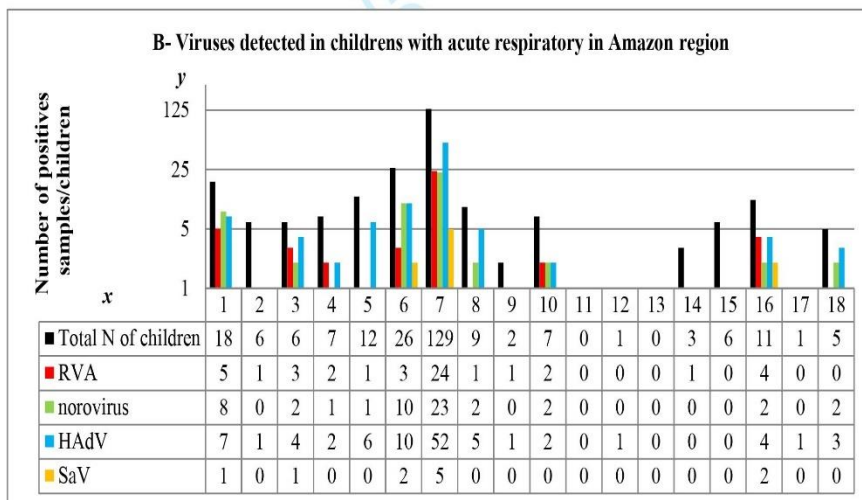
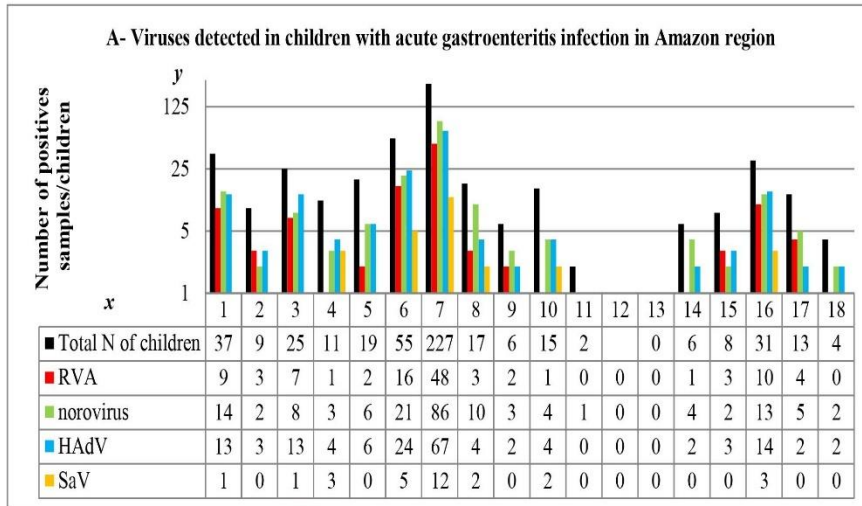
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

43. Shedden WI, Potter CW. Comparative susceptibility to adenovirus infection of children of blood groups A and O. *Nature*. 1964; 202:505-6.

44. McDonald JC, Zuckerman AJ. ABO Blood Groups and Acute Respiratory Virus Disease. *Br Med J*. 1962; 2(5297):89-90.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



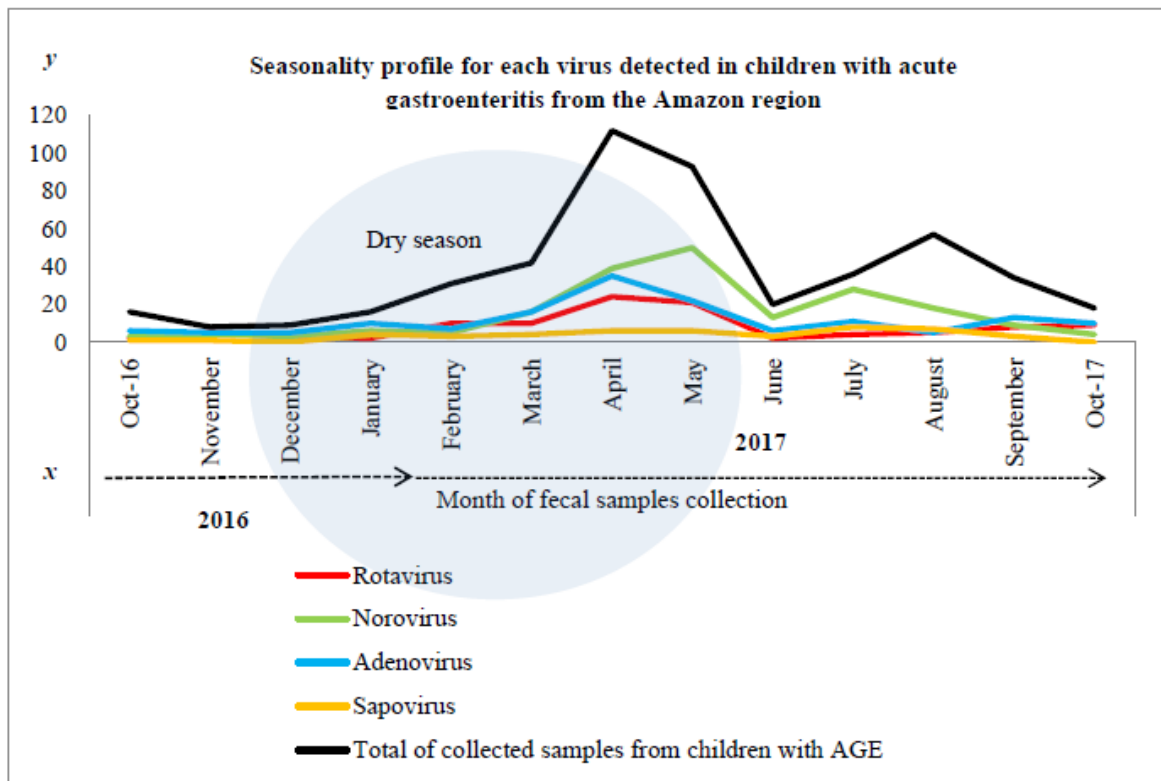
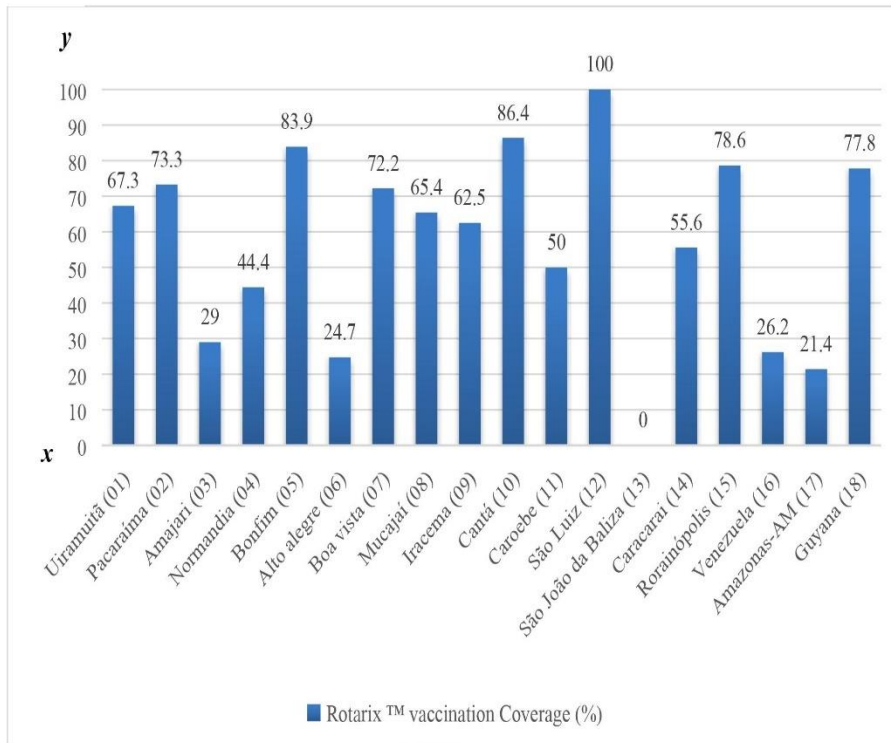


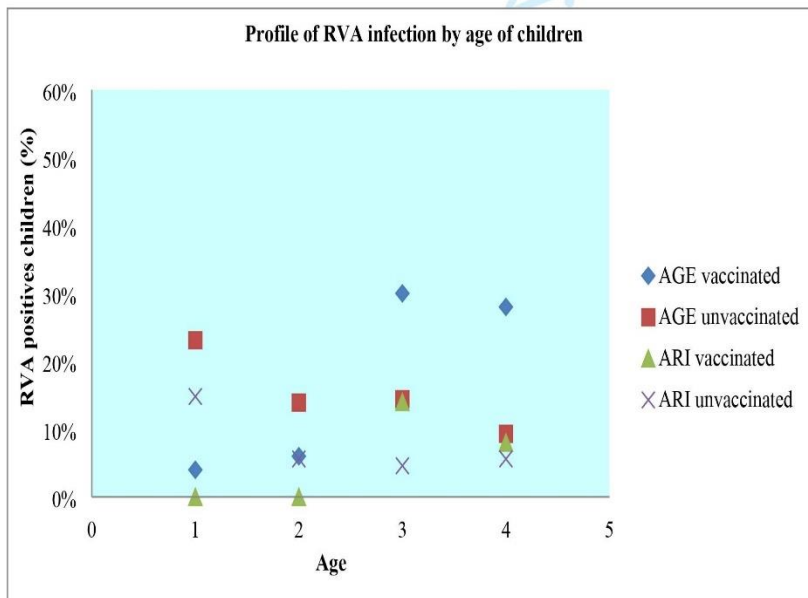
Figure 2. Seasonality profile of rotavirus A (RVA), norovirus, Human Adenovirus (HAdV) and Sapovirus (SaV), detected in the feces of children with acute gastroenteritis (AGE) living in the Amazon region. The dry months (low water season) are highlighted by the light blue circle (December to May). The remaining months (June to November) are rainy (wet season) according to the Brazilian National Institute for Space Research (INPE) (<http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliesp10a/fish.html>). The months of sample collection for this study are indicated on the x axis and number of samples for each month on the y axis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

A



B



1
2
3 Figure 3. **A.** *Rotarix*TM (RV1) vaccination coverage. The graph shows the RotarixTM (RV1) vaccination coverage in
4 the different municipalities of the states of Roraima (Brazil) and Amazonia, and the countries of Venezuela and
5 Guyana. Roraima borders with the state of Amazonas, and the countries Venezuela and Guyana. 0 = None of
6 children from the “São João da Baliza” municipality were attended at “Hospital da Criança de Santo Antonio”;
7 Numbers within parentheses correspond to:- municipalities of Roraima state, Brazil, these being: 1.Uiraimutã; 2.
8 Pacaraima; 3.Amajari; 4. Normandia; 5. Bonfim; 6. Alto Alegre; 7. Boa Vista; 8. Mucajaí; 9. Iracema; 10. Cantá; 11.
9 Caroebe; 12. São Luiz; 13. São João da Baliza; 14. Caracará; 15. Rorainópolis; -16. Venezuela; -17. Amazonas
10 (state of Brazil); -18. Guyana. Axis *a* corresponds to municipality names and axis *y* corresponds to percentage of
11 RV1 vaccination coverage. **B.** *Profile of RVA infection by age in children from the Amazon region.* The *x* axis
12 corresponds to the age each child, being: 1= ≤3 months old; 2= >3 months ≤6 months old; 3= >6 months ≤1 year
13 old; 4= >1 year ≤2 years old; 5= >2 years ≤5 years old. The number of children enrolling in this study by age as
14 described was: 169 (1); 124 (2); 240 (3); 144 (4); 55 (5). One child with 5 years old from the unvaccinated acute
15 respiratory infection (ARI) group was not included in the Figure. The *y* axis corresponds to percentage of RVA
16 infection. AGE is acute gastroenteritis.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

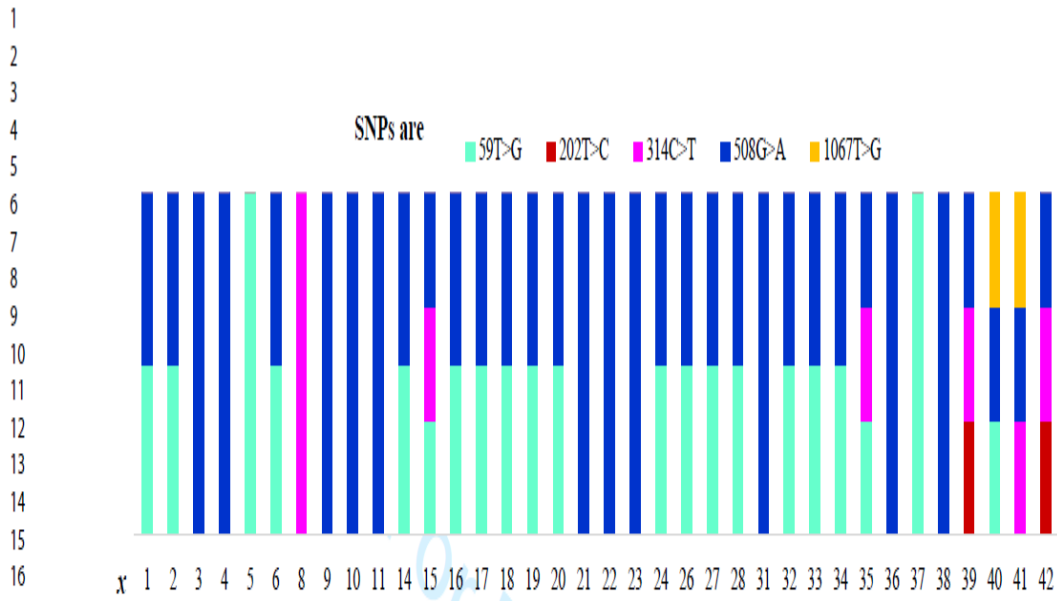


Figura 4. Graphical representation of the presence of five main *FUT 3* gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *le* gene detected in the children from the Amazon region phenotyped as *Le (a-b-)*: 1. The presence of the SNPs are represented by colors in the bars corresponding to each child; 2. Children numbers 7, 12, 13, 25, 29 and 30 did not have any of the five main SNP; 3. The five main SNPs are rs28362459 (59T>G), rs812936 (202T>C), rs778986 (314 C>T), rs3745635 (508G>A and rs3894326 (1067T>G).

Table 1: Results of Lewis and secretor histo-blood group antigen (HBGA) profile phenotyping for the children from the Amazon region (Brazil, Venezuela and Guyana). Children were grouped by virus detected in feces: A. rotavirus A (RVA); B. norovirus; C. human adenovirus (HAdV). Sapovirus (SaV) was excluded from this analysis because the number of positive samples was not representative. The secretor and non-secretor profiles were confirmed after the detection of Fuca1-2Gal-R, using a lectin-based Enzyme Immunoassay (EIA). Weak secretor profile was defined as previously described (Moraes et al. 2019). The odds ratio (OR) and confidence interval (CI) were calculated according to SZUMILAS (2010). Confidence intervals less than 1 were considered statistically significant.

A

Lewis Antigen/Secretor	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
Lea+Leb+ (weak secretor)	61 (16.6%)	27 (10.8%)	1.15	1.15
Lea-Leb+ (secretor)	27 (5.6%)	13 (5.2%)	1.06	1,55
Lea+Leb- (non-secretor)	4 (0.8%)	2 (0.8%)	1.02	5.43
Lea-Leb- (non-secretor)	18 (3.7%)	6 (2.4%)	1.54	3.33

B

Lewis Antigen/Secretor	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
Lea+Leb+ (weak secretor)	87 (17.9%)	34 (13.6%)	1.31	1.15
Lea-Leb+ (secretor)	57 (11.7%)	10 (4.0%)	2.92	4.36
Lea+Leb- (non-secretor)	9 (1.8%)	4 (1.6%)	1.15	3.42
Lea-Leb- (non-secretor)	31 (6.4%)	5 (2.0%)	3.18	7,06

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

C

Lewis Antigen/Secretor	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
Lea+Leb+ (weak secretor)	82 (16.9%)	62 (24.9%)	0.67	0.50
Lea-Leb+ (secretor)	46 (9.5%)	21 (8.4%)	1.12	1.26
Lea+Leb- (non-secretor)	9 (1.8%)	3 (1.2%)	1.54	5.32
Lea-Leb- (non-secretor)	22 (4.5%)	10 (4.0%)	1.13	1.90

For Peer Review

Table 2: Results of ABO histo-blood group antigen (HBGA) profile for the children from the Amazon region (Brazil, Venezuela and Guyana). The children were grouped by virus detected in feces: A. rotavirus A (RVA); B. norovirus; C. human adenovirus (HAdV). Sapovirus (SaV) was excluded from this analysis because the number of positive samples was not representative. The odds ratio (OR) and confidence interval (CI) were calculated according to SZUMILAS (2010). Confidence intervals less than 1 were considered statistically significant.

A

Blood Group	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
A	8 (1.5%)	6 (2.4%)	0.68	1.75
B	1 (0.2%)	2 (0.8%)	0.25	2.75
AB	1 (0.2%)	0	-	-
O	100 (20.6%)	39 (5.7%)	1.31	1.08

B

Blood Group	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
A	13 (2.7%)	2 (0.8%)	3.33	14
B	5 (1%)	0	-	-
AB	2 (0.4%)	0	-	-
O	164 (33.8%)	51 (20.5%)	1.65	1.18

C

Blood Group	Total samples = 734			
	AGE = 485 (100%)	ARI n= 249 (100%)	OR	CI
A	9 (1.8%)	8 (3.2%)	0.28	0.52
B	5 (1%)	4 (1.6%)	0.64	2.23
AB	0	0	-	-
O	150 (31%)	86 (34.5%)	0.88	0.55

Capítulo III: Detecção e genotipagem de bocavírus em crianças de 0 a 5 anos da região amazônica (Brasil, Venezuela e Republica Federativa da Guiana) (Artigo 2).

Artigo 2: *Human bocavirus 1 and 2 genotypes detected in younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections respectively.*

Objetivos específicos relacionados à tese:

2.2.1. Avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos e a prevalência de vírus responsáveis pela etiologia das DDAs na população de estudo, utilizando como grupo controle crianças na mesma faixa etária e acometidas por IRA;

Publicado na revista: International Journal of Infectious Diseases

Fator de impacto: 3.538



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

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

Human Bocavirus genotypes 1 and 2 detected in younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections, respectively

Gabriel Azevedo Alves Leitão^{a,b,1}, Alberto Ignácio Olivares Olivares^{c,1},
Yan Cardoso Pimenta^a, Isabella Fernandes Delgado^{b,*}, Marize Pereira Miagostovich^a,
José Paulo Gagliardi Leite^a, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{a,*}

^aLaboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bPost-Graduate Program in Sanitary Surveillance, National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cPost-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2019

Received in revised form 12 March 2020

Accepted 18 March 2020

Keywords:

Bocavirus
acute gastroenteritis
acute respiratory infection
Amazon region

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to verify the frequency, genotypes, and etiological role of Human Bocavirus (HBoV) in younger Amazonian children with either acute gastroenteritis (AGE) or respiratory infections (ARI). The influence of RotarixTM vaccination and co-infection status was also investigated.

Design: HBoV quantitative polymerase chain reaction (qPCR) testing was done on both fecal and saliva (1468 samples) from 734 children < 5 months old living in the Amazon (Brazil, Guyana, and Venezuela). High and median HBoV viral load samples were used for extraction, nested PCR amplification, and sequencing for genotyping. HBoV mRNA detection was done by reverse transcription following DNA amplification.

Results: The overall HBoV frequencies were 14.2% (69/485; AGE) and 14.1% (35/249; ARI) ($p = 0.83$). HBoV exclusively infected 4.5% (22/485; AGE) and 4% (10/249) of the Amazonian children (Odds ratios 1.13, 95% confidence interval = 2.42–0.52). HBoV 1 was mainly detected in feces and saliva from AGE children; and HBoV2, from ARI children. HBoV mRNA was detected only in feces. The RotarixTM vaccination status did not affect the HBoV frequencies.

Conclusions: We suggest that, after entry into the air/oral pathways, HBoV1 continues infecting toward the intestinal tract causing AGE. HBoV2 can be a causative agent of AGE and ARI in younger Amazonian children.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Despite Human Bocaviruses (HBoV) having been discovered from nasopharyngeal samples from children with an acute respiratory infection (ARI) (Allander et al., 2005), they are currently considered to be emerging viruses that could be associated with cases of acute gastroenteritis (AGE) that have occurred after the

introduction of the rotavirus A (RVA) vaccines by National Immunization Programs (NIP) worldwide (Qiu et al. 2017). The HBoV contains a single linear DNA genome organized into 3 ORFs, where ORF1 and ORF2 encode the non-structural proteins NS1 and NP1, and ORF3 encodes the VP1 and VP2 capsid proteins. HBoV is classified as genotype 1 through 4 (Guido et al. 2016).

In this study, the presence of HBoV was investigated in feces and saliva from children presenting either AGE or acute respiratory infection (ARI) living in the Amazon region. The objective of this study was to verify the frequency of HBoV in these two groups with different RotarixTM (RV1) RVA vaccinal statuses, as well as with and without RVA, norovirus and HAdV co-infections, while also identifying the genotypes infecting AGE or ARI children under 5

* Corresponding authors.

E-mail addresses: baroni@ioc.fiocruz.br (M.T.B.d. Moraes), isabella.delgado@iocruz.br (I.F. Delgado).

¹ The authors contributed equally to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.046>

1201-9712/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

months old. The detection of HBoV DNA and messenger RNAs (mRNA) using a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was also performed to provide data and an argument for HBoV1 infecting the host through both oral and respiratory tracts, reaching the gastrointestinal tract and causing AGE. This phenomenon could explain the cases of HBoV1 that cause AGE in Amazonian children.

Methods

Study population

This study was approved by the Federal University of Roraima Ethical Research Committee (CEP No: 1.333.480 from November 23, 2015). A total of 734 children (430 boys and 304 girls) of under five months of age were enrolled in this study and are divided into two groups: 485 presenting AGE and 249 presenting ARI (non-AGE-symptomatic control samples). All children included here were seen at "Hospital da Criança de Santo Antonio" (HCSA) in the city of Roraima (RR-state, Brazil). All children live in Brazil, Venezuela, or Guyana, including demarcated indigenous areas from the Amazon rainforest (Moraes et al., 2019). Fecal and saliva (containing epithelial cells) samples were collected in parallel from each child after an informed consent form was signed by the parents or guardians and processed according to what was previously published (Carvalho-Costa et al., 2019; Moraes et al., 2019;). Fecal samples had already been tested for RVA, GI and GII norovirus and adenovirus (HAdV) (unpublished results). The Rotarix™ (RV1) RVA vaccine was the only vaccine administered by the Brazilian NIP (Moraes et al., 2019).

The quantitative PCR for human Bocavirus detection in fecal samples and saliva format

A duplex real-time assay was established and formatted for the detection of HBoV and HAdV (HAdV, unpublished results), based on a previously developed qPCR for those viruses (Portes et al., 2017). The method was first tested using samples already previously defined as HBoV, standard curves, and the non-template controls (NTC), available in the RRR-LVCA, all in duplicate. The specificity of the test was verified comparing the positivity, and the cycle threshold (C_t) values obtained with those already known for the samples tested (Portes et al., 2017). Only sigmoidal curves were considered. The HBoV NTC is named as CI-027 (C_t value 18.02). Primers and probes (FAM-labeled HBoV) used were as previously described by Kantola et al. (2010). To verify unspecific qPCR reactions between HBoV and HAdV, these viruses were tested in a monoplex qPCR format, before proceeding with the duplex format, with parameters defined as described below. The sensitivity of the qPCR was determined using two double-stranded (ds) DNA fragments (gBlock® Gene Fragment, Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) designed to contain both viruses' target regions amplified by the primers described above, based on the HBoV1 to -4 genome (VP1-VP2 junction). A 10-fold serial dilution of gBlock® was used to generate a standard curve between log standard concentrations (6×10^7 to 6×10^1 copies per reaction for HAdV and 1×10^6 to 1×10^1 for HBoV) following the formula: Copy number = (DNA amount (ng) \times 6.022 \times 1023 / length (bp) \times 109 216 \times 650). The C_t of each standard concentration is already known, making it possible to identify the viral load of each positive sample.

Detection of human Bocavirus in fecal samples and saliva from Amazonian children by quantitative PCR

Total viral nucleic acid from feces was extracted as previously described (Moraes et al., 2019). Five microliters of extracted

DNA were used for the duplex qPCR. The reactions were conducted using the QuantiTect® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations in a total volume of 20 μ L and with optimized thermal cycling conditions as follows: an enzyme activation step at 95 °C for 15 min, 45 cycles of PCR amplification at 94 °C for one min, and at 60 °C for one min. All qPCR reactions were conducted on the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California, USA). Samples that showed signals crossing the threshold line in both replicas up to a C_t value of 42.00, and presented a characteristic sigmoid curve, were regarded as positives. Samples detected as positives and with a C_t of less than 33 had the total nucleic acids (DNA/RNA) extracted from their respective saliva samples (collected in parallel from the children) via a method described by Moraes et al. (2019) and amplified by qPCR as described above.

Human Bocavirus genotyping by nucleotide sequencing

Preliminary nested PCR was performed according to the C_t values obtained by the duplex qPCR, these being: -Three samples with C_t below 20; - three with C_t between 20 and 30; - three with C_t between 31 and 40. The nested PCR protocol (First and second rounds) applied to the preliminary and final amplification was: Denaturation at 94° for 30 sec. (first round 95 °C during five min), 35 cycles of denaturation at 94° - 15 sec., anneal at 55 °C - 15 sec., and extension at 68 °C - one min. The Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity enzyme was used according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Amplicon purification was performed as previously described (Moraes et al., 2019). Sanger nucleotide sequencing was done using primers for the HBoV second round nested PCR as previously described (Chow et al., 2010).

Sequences analysis

For the construction of HBoV phylogenetic trees, VP1 gene nucleotide and amino acid multiple alignments were done using the Mega -Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version X software (Kumar et al., 2018; Chow et al., 2010) and the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) on results from saliva and fecal samples, and the references sequences obtained from the GenBank database at NCBI for HBoV1, HBoV2, and HBoV3 VP1.

Detection of human Bocavirus messenger RNA in fecal and saliva samples genotyped as HBoV1

Fecal and saliva HBoV1 and HBoV2 were tested for the presence of messenger RNA (mRNA). Total nucleic acid extracted was submitted to enzymatic digestion using amplification grade DNase I (without RNase activity) (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA), according to the manufacturer's instructions. The samples were submitted to reverse transcription following DNA amplification using a SuperScript® III Platinum® One-Step qRT PCR system (Invitrogen, California, EUA) according to manufacturer instructions and using the same primers for qPCR (Portes et al., 2017). The parameters were: Reverse transcription at 50 °C during 30 min., enzyme activation at 95 °C during ten min., 40 cycles of denaturation at 95° - 15 sec., anneal and extension at 60 °C - one min., ending in a 4 °C holding stage. Samples that were submitted to enzymatic digestion with DNaseI were checked for the presence of residual DNA by qPCR as previously described.

Statistical analysis of data

The Statistica 12.6 (December 2014) software was used for all statistical analyses. The statistical tests applied in this study were Pearson Chi-Square (Differences were considered statistically significant at *P* values greater than 0.05) (Pearson, 1900) and odds ratios (OR) (Szumilas, 2010).

Results

The Bocavirus frequencies were similar for the groups of children either with acute gastroenteritis or respiratory infection

The tests with NTCs confirmed their already known C_t values, demonstrating the specificity of the qPCR for HBoV detection in saliva and fecal samples. The qPCR revealed 104 samples positive for HBoV, 10.2% (31/304) from girls, and 17% (73/430) from boys. The HBoV detection rate was: Guyana 20% (1/5); Venezuela 14.3% (6/42); Brazil, state of Roraima 14.1% (95/673), and the state of Amazonas 14.3% (2/14). Table 1A shows the frequency of HBoV being similar in the groups of AGE and ARI children, at 14.2% (69/485) and 14.1% (35/249) (*p*-value = 0.83) respectively. HBoV infection frequency was evaluated exclusively (without considering co-infection with other viruses) or as a co-infection with HAdV, norovirus, and RVA for either AGE or ARI groups. The exclusive HBoV frequency for the AGE group was 4.5% (22/485) and 4.0% (10/249) for the ARI group. HBoV infection frequency was almost double the ARI frequency (1.6%; 4/249) in the AGE group (3.3%; 16/485), when in co-infection with norovirus. On the other hand, for HAdV and RVA in co-infection with HBoV, lower frequencies were shown for AGE (HAdV = 1.2%, 6/485 and RVA 0%) than for ARI (HAdV = 4.8%; 12/249 and RVA = 0.8%; 2/249) (Table 1B). For each infection profile, with HBoV exclusively, HBoV + RVA, HBoV + norovirus, and HBoV + HAdV, the odds ratio (OR) was calculated and was of 1.13, 0, 2.05 and 0.26, respectively. The confidence interval (CI) of 95% for exclusive HBoV was 2.42 – 0.52

(no-significance 1.9), 0 for HBoV + RVA, 6.19 – 0.52 (no-significance value 5.67) for HBoV + norovirus and 0.70 – 0.09 (significance value of 0.61) for HBoV + HAdV. The status of Rotarix™ (RV1) vaccination was considered, and Table 1C shows that no difference could be detected, considering the frequencies for the AGE group in vaccinated children (15.6%; 30/192) was almost equal for the unvaccinated (12.6%; 37/293). For the ARI group, these frequencies were 14.9% (15/101) and 14.2% (21/148) for the vaccinated and unvaccinated groups, respectively (Table 1C). The frequency of HBoV was high in the Boa Vista municipality, state of Roraima, Brazil, corresponding to 49% (51/104) of the HBoV positive fecal samples. The HBoV frequencies detected in feces from children living in Venezuela and Guyana were lower, 3.8% (4/104), and 1% (1/104), respectively. The C_t values detected ranged from 19.9 to 37.0 for 10.6% (11/104) and from 37.0 to 39.4 for 89.4% (93/104) of the HBoV1 positive fecal samples.

HBoV1 was mainly detected in AGE Amazonian children

Twenty-seven fecal and saliva paired samples were selected for genotyping, defined by C_t values below 20 and between 20 and 30. 63.1% (12/19) of the amplicons obtained from samples of AGE children and 87.5% (7/8) from samples of ARI children were sequenced, and the HBoV genotype was defined with success (Table 2). 68.4% (13/19) of genotyped HBoV were from children without co-infection, and 31.6% (6/19) were from children co-infected with HAdV (2 AGE children and 4 ARI children) (Table 2). The HBoV1 genotype was predominantly detected in fecal and saliva samples from AGE children, with 75% (9/12) detection in feces and 100% (11/11) in saliva. The HBoV2 genotype was detected in 25% (3/12) of the remaining fecal samples from AGE children. The HBoV2 genotypes were predominant and detected in 71.4% (5/7) of samples from ARI children. Only one sample of the HBoV3 and HBoV1 genotypes was detected in children presenting ARI, the detection rate was 14.3% (1/7) for each one. Table 2 summarizes these results.

Table 1

Frequency of Human Bocavirus (HBoV) detected in the Amazon region in two different groups of children, these being acute gastroenteritis (AGE) and acute respiratory infection (ARI): **A.** HBoV positivity without considering HBoV with other enteropathogens; **B.** HBoV co-infection with norovirus and human adenovirus (HAdV).

A			
Group of children (734)	HBoV positivity 104 (%)		<i>p</i> * value
AGE (485)	69 (14.2%)		<i>p</i> = 0.83171
ARI (249)	35 (14.1%)		
Note: * - The value of significance (<i>p</i> -value) was found comparing both groups of children presenting their clinical symptoms.			
B			
Virus (es) detection rate	Groups of children n = 734 (100%)		
	AGE n = 485 (100%)	ARI n = 249 (100%)	OR
HBoV only	22 (4.5%)	10 (4.0%)	1.13
HBoV + RVA	0 (0.0%)	2 (0.8%)	0
HBoV + norovirus	16 (3.3%)	4 (1.6%)	2.05
HBoV + HAdV	6 (1.2%)	12 (4.8%)	0.26
Note: * - The odds ratio (OR) was calculated for each infection profile, these being: HBoV exclusively (1.13); HBoV + RVA (0.0); HBoV + norovirus (2.05); HBoV+HAdV (0.26). The confidence interval (CI) of 95% for HBoV alone was 2.42 – 0.52 (no-significance 1.9), 0 for co-infection by RVA and HBoV, 6.19 – 0.67 (no-significance value 5.67) for co-infection by HBoV and norovirus and, for co-infection by HBoV and HAdV, 0.70 – 0.09 (significance value of 0.61).			
C			
Groups of children (n = 734)	HBoV positivity and vaccination status		
AGE n = 485	Vaccinated n = 192		Unvaccinated n= 293
	30 (15.6%)		37(12.6%)
	<i>p</i> * = 0, 35218		
ARI n = 249	Vaccinated n = 101		Unvaccinated n= 148
	15 (14.9%)		21 (14.2%)
	<i>p</i> = 0, 88412		
Note: * The Pearson Chi-Square [19] test was applied to define the level of marginal significance (Valor <i>p</i>) in comparison to the positive and negative HBoV results found in each AGE and ARI group.			

Table 2

HBoV genotype defined by sequencing nucleotides from DNA amplicons obtained from fecal and saliva samples. The samples also had their DNA digested and were submitted to mRNA amplification. **A.** Group of children presenting acute gastroenteritis (AGE); **B.** Group of children presenting acute respiratory infection (ARI).

Child identification	HBoV genotype	
	Feces	Saliva
A		
Child 1	HBoV1	HBoV1
Child 2	HBoV1	HBoV1
Child 3	*	HBoV1
Child 4	HBoV2	*
Child 5	HBoV1	HBoV1
Child 6	HBoV1	HBoV1
Child 7	HBoV1	HBoV1
Child 8	HBoV1	HBoV1
Child 9	HBoV2	HBoV1
Child 10	HBoV1	HBoV1
Child 11	HBoV1	HBoV1
Child 12	HBoV1	HBoV1
B		
Child 13	HBoV3	*
Child 14	HBoV2	*
Child 15	HBoV2	HBoV1
Child 16	HBoV2	*
Child 17	HBoV2	HBoV1
Child 18	HBoV1	HBoV1
Child 19	HBoV2	HBoV2

Notes: * - The DNA amplicons obtained from these saliva samples was not of good enough quality to provide comprehensive nucleotide sequences.

Bold and underlined samples had their mRNA amplified.

AGE children 4, 11, and ARI children 13, 15, 18, and 19 were HAdV co-infected presenting Ct values of 31.8, 40.2, 36.53, 36.12, 37.15, and 42.91, respectively.

A phylogenetic tree (Fig. 1A) shows the evolutionary proximity between HBoV1, HBoV2, and HBoV3 detected in feces and saliva and others that have been identified in children living in the Amazon region (states of Acre, Amazonas, Pará, Roraima, and Tocantins), Rio de Janeiro and Goiás. HBoV1 nucleotide sequences detected from the AGE children 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 share equal similarities between them, regardless of whether they were recovered from fecal or saliva samples. Children 18 and 19, from the ARI group and genotyped respectively as HBoV1 and HBoV2, also share equal similarity between fecal and saliva samples. All these children were clustered in the same clade in the phylogenetic tree, together with reference sequences from the Amazon region and other Brazilian states (Rio de Janeiro, Goiás), except for nucleotide sequences recovered from child 12 (feces and saliva) clustered in a separated clade and with a bootstrap of 85%. HBoV3 nucleotide sequences were recovered from the feces of ARI child 13 living in Mucajá (Fig. 1B) and presented a 99% similarity with the reference sequence MH 003678.1 from the Amazonas state (Fig. 1A and B). The quality of the DNA recovered from child 13's saliva was not adequate for defining the HBoV genotype. The nucleotide sequence from child 19 shares equal similarity between fecal and saliva samples and was HBoV2. The nucleotide sequence recovered from the feces of children 9, 15, and 17 were similarly HBoV2; however, these sequences recovered from saliva were similar to HBoV1. The DNA recovered from feces of children 4, 14, and 16 were similar to HBoV2, and the saliva from these children did not provide nucleotide sequences adequate enough to determine the HBoV genotype. The HBoV2 genotyped samples from children enrolled in this study were clustered together with reference sequences from the states of Goiás, Rio de Janeiro (child 9), Tocantins, and Amazonas (child 15). The remaining (children 4, 14, 16, 17, and 19) were clustered in a separate clade.

Messenger RNA was detected only in feces but not in saliva

Successfully genotyped HBoV positive fecal and saliva samples were used to verify the presence of mRNA (Table 2). The detection rate of mRNA was 21.0% (4/19) and only on fecal samples. Messenger RNA was not detected in any saliva samples. Three HBoV1 mRNA positive samples were from AGE children 5, 11, and 12; one HBoV2 mRNA positive sample was from ARI child 19. Children 11 and 19 were HAdV co-infected (Table 2).

Discussion

The similar frequency detected of 14% both for the AGE and ARI groups of children could be explained by HBoV having been associated with both the clinical conditions (Qiu et al. 2017). The global HBoV prevalence in both children and adults was estimated from 2005 to 2016 (Guido et al., 2016), including studies evaluating AGE and ARI, for HBoV exclusively: 5.9% (95% CI: 5.7–6.1) for AGE cases and 6.3% (95% CI: 6.2–6.4) for ARI cases. This prevalence was very similar to our study. For co-infections, the prevalence was of 46.7% (95% CI: 44.2–49.2) for AGE cases, and ranged from 8.3% (95% CI: 0.0–19.4) to 100% for ARI cases. These authors also presented the prevalence for Brazil: 4.8% (95% CI: 4.0–5.7; HBoV exclusively) and 15.1% (95% CI: 8.7–21.6; co-infection). For ARI cases, 10.8% (95% CI: 9.6–11.9; HBoV exclusively) and 90.1% (95% CI: 86.7–93.5; co-infection). In our study, the frequency was similar to that reported for Brazil in 2016, considering HBoV infection exclusively or in co-infection in AGE children. Otherwise, the frequency reported for ARI children in the 2016 study (Guido et al., 2016) was very different from that detected in our study, considering either HBoV exclusively or in co-infection, as we detected low frequencies ranging from 0.8% to 4.0% at maximum, even considering the co-infection. The number of samples collected in one year from Roraima, Brazil was very representative (n = 673), and children presenting AGE living in Roraima state were mainly HBoV infected rather than presenting ARI (AGE 59.6%; 62/104; ARI 40.4%; 42/104).

Recently Soares et al. (2019) reported an HBoV detection rate of 24.0% (54/225) in samples from AGE children under 5 years old living in Brazil in the Amazon region, where most of the samples were collected from children living in the states of Acre, Amazonas, and Para, and only one sample was from Roraima.

In our study, RVA and norovirus co-infections could be excluded from considering HBoV as the causal viral agent of AGE. RVA and noroviruses are the two primary etiological agents of acute gastroenteritis (AGE) in children under 5 years old (Tate et al., 2016; Pires et al., 2015; Ahmed et al., 2014). HAdV is a significant viral agent of ARI (Ison and Hayden, 2016), and could be excluded for the ARI group, for HBoV to be an eligible causal viral agent of ARI. 4.5% (22/485) of AGE children were infected only by HBoV, and 3.3% (15/435) were infected by both HBoV and norovirus. 4.0% (10/249) of ARI children were infected only by HBoV, and 4.8% (12/249) were infected by both HBoV and HAdV. The similar frequencies detected in both AGE and ARI for HBoV exclusively give this virus the status of a viral causal agent for both infections, but of low frequency in the Amazon region. Concerning HBoV co-infection with RVA, no HBoV positive fecal sample was detected in the AGE group of children. In Brazil, HBoV and RVA co-infection causing AGE was detected in higher frequencies just after the introduction of the RV1 vaccine, with rates of 64.3% (9/14) (Sousa et al., 2012) and 21.4% (3/14) (Albuquerque et al., 2007). In 2017, Portes et al. (2017) conducted a study involving 200 HIV-1 and 125 non-HIV positive AGE children, and the frequency of HBoV and RVA co-infection was low, corresponding to 1.5% and 0.8% for the two groups, respectively. The RV1 vaccinal status can affect the frequencies of viruses other than RVA, as what happened with norovirus (Ahmed et al., 2014). However, for the children enrolled

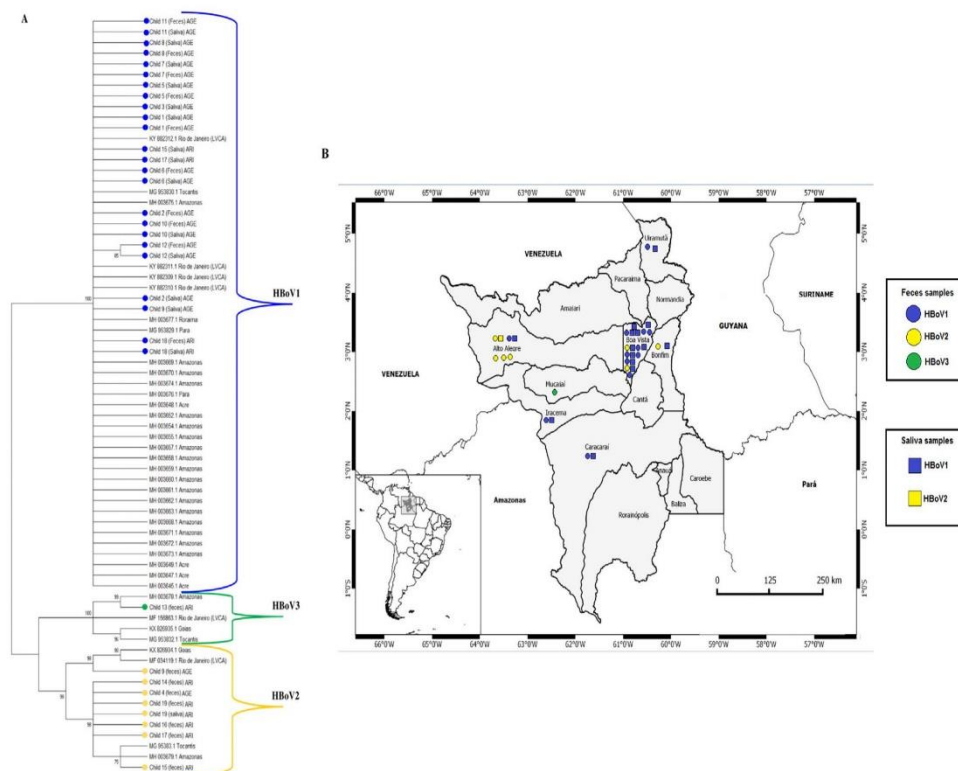


Fig. 1. A. Phylogenetic tree encompassing the genotyped Bocavirus 1 (HBoV1), 2 (HBoV2), and 3 (HBoV3) detected in feces and saliva samples from Amazonian children. Each child was identified by numbers. References GenBank samples were included and accessed according to their reference numbers. The analysis was inferred by using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model [1]. All bootstrap-calculated values were above 70%, as estimated with 2,000 pseudo-replicate data sets at each node. B. Map of the state of Roraima showing the municipalities where the children whose samples were collected live, as well as the Brazilian states and countries with which it borders. Adapted from Landscape Metrics Lab, Department of Geography - Federal University of Roraima (<http://ufr.br/mepa/>). The HBoV 1, 2, and 3 are represented by colored circles or squares, respectively, if they were detected in the feces or saliva.

in this study, the RV1 vaccinal status did not affect the HBoV detection rates because the frequencies were similar for the AGE and ARI groups in vaccinated and unvaccinated groups. Studies have shown the presence of HBoV in association with other potential pathogens for both AGE and ARI children, which led to the hypothesis that the virus may be a “harmless passenger” (Schildgen et al., 2008). In our study, the detection rate of HBoV was also low, excluding co-infections with norovirus. The C_t criterion up to 30.0 selected mainly HBoV positive fecal samples without co-infection.

In our study, the HBoV1 genotype was predominantly detected in feces and saliva samples from AGE children, with 75% (9/12) detected in feces and 100% (11/11) in saliva. The HBoV2 genotype was detected in 25% (3/12) of the remaining fecal samples from AGE children. The HBoV2 genotypes were predominant and detected in 71.4% (5/7) of samples from ARI children. The prevalence of HBoV1 under HBoV2 (respectively 94.8% and 2.6%) from AGE samples was also reported by Soares et al. (2019). Unfortunately, scarce data concerning HBoV genotype frequency is available for Brazil. HBoV1 is mainly associated with ARI, despite having also been detected in samples from AGE children (Guido et al., 2016; Schildgen, 2013; Chow & Esper, 2009). HBoV2 and HBoV3 are rarely detected in respiratory secretions, but frequently so in fecal samples from children with AGE (Paloniemi et al., 2014; Chow et al., 2010; Arthur et al., 2009). HBoV4, although rarer, has already been found in fecal samples (Kapoor et al., 2010, 2009).

Since samples from ARI children served as non-AGE children-symptomatic control samples, we could infer that HBoV1 is a causative agent of AGE since we detected mRNA in fecal samples only from AGE children that were infected only by this agent without co-infection (two samples).

HBoV1 and HBoV2 mRNA (one from AGE and one from ARI children respectively) were detected in two HBoV and HAdV co-infected fecal samples; however, the C_t values were very high for HAdV (40.2 and 42.91, respectively). The C_t values that reflect the viral load could be very complicated for HBoV detection and association of this agent as causative of disease. The HBoV viral load usually is low and also could persist on the tissues such as the nasopharynx and tonsils (Ivaska et al., 2019), not reflecting real infection. The HBoV1 infection cannot be diagnosed with standard DNA PCR; quantitative PCR and serology are better diagnostic approaches. Because of their high clinical specificity, HBoV1 mRNA, and antigen detections have shown promising results (Christensen et al., 2019).

The phylogenetic analysis showed, for most of the HBoV nucleotide sequences, a similarity between HBoV genomes detected from feces and saliva, reflecting both the persistence of this virus and its probable migration from the respiratory to the intestinal tract. This similarity also indicates that even for ARI children, there is shedding towards the feces. Children living in the Amazon region mainly in the state of Roraima have been infected by the same HBoV1, HBoV2, and HBoV3 that are circulating in other Amazon regions, because the nucleotide sequencing showed more

similarity to samples from the Amazon region than samples from Rio de Janeiro and Goiás. However, the HBoV1 recovered from child 12 was notably different (bootstrap of 85).

An explanation for the detection of HBoV1 causing AGE more often than ARI could be that there is no physical separation of children presenting either AGE or ARI at HCSA. This condition could benefit this genotype in infecting the intestinal tract.

The detected genotypes HBoV1 and HBoV2 were mainly from children living respectively in Boa Vista (the capital of Roraima) and Alto Alegre (indigenous rainforest). There are a lot of factors contributing to the diversity of HBoV samples detected infecting children living in the Amazon region from families presenting a strong indigenous ethnicity, including genetic and cultural aspects.

Conclusions

The similar HBoV frequencies detected either in AGE or ARI children from the Amazon region show that the genotype 1 is probably the causative agent of AGE, infecting children eventually by the oral or air pathways towards to the intestinal tract, being eliminated in feces (HBoV1 mRNA detection). Despite HBoV2 having been frequently associated with AGE, in our study, this genotype could be an etiological viral agent causative of ARI in children < 5 months old.

Conflict of interest

The authors are unaware of any conflict of interest.

Funding

We are grateful for support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES): “Print-Fiocruz-CAPEs” and “Programa de Professor Visitante no Exterior-Edital no. 01/2019-Processo 88881.337140/2019-01”; The National Council for Scientific and Technological Development – CNPq number 424376/2016-4; Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro-FAPERJ “Edital Carlos Chagas Filho” and Oswaldo Cruz Institute- IOC (PAAF).

Acknowledgments

The authors acknowledge all children and their parents for making this study possible. Thanks to Professor Dr. José Francisco Luitgards Moura, coordinator of ObservaRR for all his support throughout the Project and for his teachings on indigenous culture. Thanks to Fábio Correia Malta for scientific remarks and Bruno Baroni de Moraes e Souza for the English revision.

References

- Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14:725–30.
- Albuquerque MCM, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramirez ML, et al. Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenteritis. *Brazil. Emerg Infect Dis* 2007;13(11):1756–8.
- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12891–6.
- Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000391.
- Carvalho-Costa FA, de Assis RMS, Fialho AM, Araújo IT, Silva MF, Gómez MM, et al. The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. *BMC Pediatr* 2019;19:42.
- Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol* 2010;47(2):143–7.
- Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med* 2009;29(4):695–713.
- Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Döllner H, Altunbulakli C, et al. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health* 2019;3:418–26.
- Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2016;22:8684–97.
- Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr* 2016;4(4).
- Ivaska LE, Christensen A, Waris M, Puhakka T, Vuorinen T, Allander T, et al. No Correlation Between Nasopharyngeal Human Bocavirus 1 Genome Load and mRNA Detection or Serology in Adeno-Tonsillectomy Patients. *J Infect Dis*. 2019;220:589–93.
- Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kiveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *Journal of clinical microbiology* 2010;48(11):4044–50.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 2010;201:1633–43.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chiochansin T, Naeem A, Shaukat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* 2009;199:196–200.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547–9.
- Moraes MTB, Olivares AIO, Fialho AM, Malta FC, e Mouta, Junior SS. Phenotyping of Lewis and secretor HBCA 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;70:61–6.
- Paloniemi M, Lappalainen S, Salminen M, Kätkä M, Kantola K, Hedman L, et al. Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. *Eur J Pediatr*. 2014;173(8):1051–7.
- Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos Mag Series 5* 1900;50:157–75.
- Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleeschauwer B, Hall AJ, Kirk MD, et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One* 2015;10(12):e0142927.
- Portes SAR, Carvalho-Costa FA, Rocha MS, Fumian TM, Maranhão AG, de Assis RM, et al. Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *PLoS one* 2017;12(8):e0183196.
- Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. *Clinical microbiology reviews* 2017;30(1):43–113.
- Schildgen O. Human bocavirus: lessons learned to date. *Pathogens*. 2013;2(1):1–12.
- Soares LS, Lima ABF, Pantoja KC, Lobo PS, Cruz JF, Guerra SFS, et al. Molecular epidemiology of human bocavirus in children with acute gastroenteritis from North Region of Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 2019.
- Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections?. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:291–304.
- Sousa TT, Souza M, Fiaccadori FS, Borges AMT, da Costa PS, Cardoso DDP. human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107:800–4.
- Szumilas M. Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian academy of child and adolescent psychiatry* 2010;19(3):227.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;10:512–26.
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis* 2016;62:S96–S105.

Capítulo IV: Primeiro relato do astrovírus humano MLB2 no Brasil detectado em fezes de crianças com gastroenterite aguda que vivem no estado de Roraima, nordeste do Brasil (Artigo 3).

Artigo 3: *First report of human astrovirus MLB2 in Brazil detected in feces of infants with acute gastroenteritis living in the state of Roraima, Northern Brazil.*

Objetivos específicos relacionados à tese:

2.2.1. Avaliar aspectos clínicos, epidemiológicos e a prevalência de vírus responsáveis pela etiologia das DDA na população de estudo, utilizando como grupo controle crianças na mesma faixa etária e acometidas por IRA.

Submetido à revista: The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Fator de impacto: 1.971

Brazilian Journal of Infectious Diseases

First report of human astrovirus MLB2 in Brazil detected in feces of children with acute gastroenteritis living in the state of Roraima, Northern Brazil

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BJID-D-20-00397
Article Type:	Short Communication
Keywords:	Human astrovirus, Acute gastroenteritis, Genotypes, Amazon
Corresponding Author:	Marcia Moraes Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/Rio de Janeiro BRAZIL
First Author:	Alberto Ignácio Olivares Olivares, Dr
Order of Authors:	Alberto Ignácio Olivares Olivares, Dr Marcia Moraes Herika Caroline Fernandes de de Queiroz, Graduated Yan Cardoso Pimenta, Graduated Jose Paulo Gagliardi Leite, PhD
Abstract:	Human astrovirus (HAstV) 1-8 and the highly divergent HAstV MLB1-3 genotypes have been detected in children both with and without acute gastroenteritis (AGE). One hundred and seventy fecal samples from children (\leq under 5 years old) with AGE living in the Amazon region were evaluated for the presence of HAstV1-8, HAstV MLB1-3 and HAstVVA1-3, with a usual RT-PCR protocol and again with a new protocol with specific primers designed to detect HAstV MLB1-3. HAstV MLB1 and HAstV MLB2 as well as the HAstV3 and 5 genotypes were detected. The frequency of HAstV MLB1-2 genotypes was of 3.5% (6/170). HAstV MLB2 was detected for the first time in Brazil.
Suggested Reviewers:	Marcelle Figueira Marques Silva, PhD Researcher, Universidade Federal de Goias Faculdade de Medicina marcelle.figueira@gmail.com researcher in the field of viruses causing acute gastroenteritis Jon Gentsch, PhD Resercher, Shanxi Center for Disease Control and Prevention jrg4@cdc.gov researcher in the field of viruses causing acute gastroenteritis



Dr. Marcia Terezinha Baroni de Moraes
Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ- Brazil

Dr. Luciano Goldani - Editor-in-Chief
Brazilian Society of Infectious Diseases

July 27, 2020

Dear Dr Luciano Goldani:

I am pleased to present an original based research manuscript, titled **“First report of human astrovirus MLB2 in Brazil detected in feces of children with acute gastroenteritis living in the state of Roraima, Northern Brazil.**

Our research group is involved with viruses that cause gastroenteritis mainly in children, and is also a reference regional laboratory in rotavirus for the Brazilian Ministry of Health, WHO and OPAS. We believe that this manuscript is appropriate for publication by this respected Journal as a **Brief Report** because it deals with original results that have not been published before concerning the Human astrovirus occurring in the Amazon region.

All **authors declare** to be in accordance with the criteria established for submission and like to suggest the following potential reviewers:

1. Dr. Jon Gentsch
Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
e-mail: jrg4@cdc.gov
2. Dr. Marcelle Figueira Marques Silva
Universidade Federal de Goiás · Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Goiás, Goiânia, Brazil
marcelle.figueira@gmail.com
3. Dr. Ferran Casals
Servei de Genòmica, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Barcelona, Spain
ferran.casals@upf.edu
4. Dr. Jesús Rodríguez-Díaz;
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain.
jesus.rodriguez@uv.es

Thank you for your consideration!

Sincerely,

Marcia T B Moraes, PhD

Oswaldo Cruz Institute-Fiocruz

Laboratory of Comparative and Environmental Virology

Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, HPP Building, room B-202

Rio de Janeiro-RJ - Brazil

Tel+ 55 (21) 25621851

Cell Phone +55 (21) 999543117

Cell Phone +46 0760579239

1 **Title page**

2

3 Alberto Ignácio Olivares Olivares^{a,b*}, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{a*&}, Herika Caroline Fernandes
4 de Queiroz^a, Yan Cardoso Pimenta^{a,c}, José Paulo Gagliardi Leite^a.

5

6 **First report of human astrovirus MLB2 in Brazil detected in feces of children with acute**
7 **gastroenteritis living in the state of Roraima, Northern Brazil.**

8

9 ^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz
10 Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

11

12 ^b Post-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation,
13 Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

14

15 ^c Post-Graduate Program in Sanitary Surveillance, National Institute for Quality Control in Health,
16 Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

17

18 * - These authors contributed equally to the manuscript;

19 & - Corresponding author;

20 E-mail address of the corresponding author: baroni@ioc.fiocruz.br; marciaterzinha4@gmail.com

21 ORCID: 0000-0002-7357-9813.

22

23 **Authors states in that the manuscript is intended to be a:** Brief communication.

24

25 **Declaration of Interest Statement:** The authors have no relevant interest(s) to disclose.

31 2016 to October 2017 from children (≤ 5 years old attended) at “Hospital da Criança de Santo Antonio”
32 (HCSA) in the city of Boa Vista, state of Roraima (RR), Northern Brazil (Ethical Research Committee
33 “CEP Number 1.333.480” from November 23, 2015 approved by the Federal University of RR). These
34 children living in Brazil, Venezuela or Guyana, including demarcated indigenous areas from the Amazon
35 and were hospitalized with AGE. Some of them were Rotarix™ (RV1) RVA vaccinated, as informed by
36 the children’s parents or guardians and verified in the vaccination card. After hospitalization caused by
37 AGE episodes all the children recovered. Complementary study design information as well as collecting,
38 processing and total RNA isolation have been reported previously⁵⁻⁷. Reverse transcription polymerase
39 chain reaction (RT-PCR) sample screening was carried out initially using a usual and “consensus”
40 protocol with the SF0073/SF0076 (respectively RdRp nucleotide position 3638-3647 and 4042-4024)
41 primers for detection of HAsV1-8, HAsV MLB1-3 and HAsVVVA1-3⁸. The segment obtained using
42 these primers has a size of 405 bp from the ORF1b (RNA polymerase) region of the AsV genome⁸.
43 Thermal cycling conditions have been previously described^{8,9}. All the samples tested by the consensual
44 protocol were also evaluated using a new RT-PCR protocol named “HAsV MLB1-3 specific”. In this new
45 protocol, the consensus primers were replaced by specific primers these being FMLB2RdRp-Forward
46 (5'AGGACCCCAAACACTACCTAG3', RdRp nucleotide position 2868-2888) and RMLB2RdRp-
47 Reverse (5' CATCCCATACAGTGGGACCA3', RdRp nucleotide position 3082-3063). These primers
48 were designed using Primer Express software v3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,
49 USA) considering the full ORF1b coding the RdRp of classic and non-classic HAsV and a genetic
50 alignment analysis was performed, comparing all classic HAsV1-8 and non-classic HAsVVVA1-3
51 sequences available in GenBank up to August 2018. The SuperScript III One Step RT-PCR System with
52 Platinum *Taq* High Fidelity DNA Polymerase® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,
53 USA) was used according to the manufacturer’s recommendations and optimized thermal cycling
54 conditions. HAsV1-6, 8 and HAsV MLB1 sample genotypes from the Regional Rotavirus Reference
55 Laboratory (RRRL-LVCA, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz) were included in all RT-PCR reactions as
56 positive controls in the “consensus” protocol or positive (HAsV MLB1) and negative (HAsV1-6, 8) in
57 the “HAsV MLB1-3 specific” protocol⁹. To verify the sensitivity of the “HAsV MLB1-3 specific”
58 protocol, total RNA from sample number 27373 was quantified by Qubit Fluorometric Quantification
59 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and tested using 1 µg, 100ng, 10ng and 1ng.
60 Additional RT-PCR amplification was performed to confirm the detection of HAsV MLB2 using a set of

61 specific primers that targeted the ORF2 region capsid as previously described¹⁰. All amplicons were
62 purified using Wizard® SV Gel and a PCR Clean-Up System kit (Promega, Madison, USA) following the
63 manufacturer's instructions. The purified amplicons were analyzed by Sanger sequencing using a
64 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the ABI Prism 3730 Genetic Analyser® (Applied
65 Biosystems, Foster City, CA, USA) and the primers described above. The nucleotide sequence alignment
66 and phylogenetic tree were constructed using the Mega-Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version
67 X software^{11,12}. Similarity was assessed using the Basic Local Alignment Search Tool
68 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Using both RT-PCR protocols ("consensus" and
69 "HAstVMLB1-3 specific") the HAstV frequency was 5.9% (10/170). Within the HAstV "classic" group,
70 HAstV5 was prevalently detected (3 samples) and only one HAstV3 was detected. Four HAstVMLB1
71 and two HAstVMLB2 were amplified using both RT-PCR protocols described in the study design
72 (frequency of 3.5%; 6/170). HAstV were detected in feces from children that live in demarcated
73 indigenous areas⁸; excluding both HAstVMLB2 samples (27341 and 27373) and the HAstV3 that were
74 collected from children living in Boa Vista, capital of RR. There were more RV1 vaccinated HAstV
75 positive children (7 children) than unvaccinated (3 children); otherwise all HAstVMLB1 positive children
76 were RV1 vaccinated. No HAstVMLB3 was detected using the "HAstVMLB1-3 specific" protocol. The
77 sensitivity of the "HAstVMLB1-3 specific" protocol was evaluated in the context of four concentrations
78 of total RNA extracted from feces according to a routine method⁵⁻⁷, these being of 1µg, 100ng, 10ng and
79 1ng. All amounts tested were able to provide HAstVMLB2 amplicons. Table 1 summarizes all the results.
80 The "consensus" protocol produced 405bp amplicons, these having been Sanger sequenced. The
81 amplicons from HAstVMLB1 (samples 26683, 27215 and 27361) positive samples did not render good
82 enough quality by Sanger nucleotide sequencing to be evaluated. The nucleotide (nt) sequences from the
83 27097 (HAstVMLB1) and 27373 (HAstVMLB2) samples, were respectively aligned together with the nt
84 sequences with access numbers AB823731.1 and KJ807479.1. These sequences show percentage identity
85 with the analyzed samples of 93% (27097) and 97% (27373), using the Basic Local Alignment Search
86 Tool. Fig.1A shows the aa sequence alignment from the partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)
87 of samples 27373 and 27097, analyzed with HAstVMLB1 (access number AB823731.1), HAstVMLB2
88 (access number KJ807479.1), and HAstVMLB3 (access number KJ807514.1) as comparative criteria.
89 Fig.1B shows the phylogenetic tree constructed based on partial amino acid sequences (121 aa) from the
90 partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) according to what has been used previously^{8,9}, where

91 HAstVMLB1 (sample 27097), HAstVMLB2 (sample 27373) and all “classic” HAstV samples detected in
92 this study were included. HAstV5 samples 26599 and 26695 showed a common proximity with a patient
93 from China (access number MF684776.1) and the sample 27093 was divergent; although classified by
94 ORF1b sequencing as HAstV5. The HAstV3, HAstVMLB1 and HAstVMLB2 samples are closely related
95 to, respectively, HAstV from Bhutan, Asia (AB823731.1) and Gambia, Africa (KJ807479.1). The
96 “HAstVMLB1-3 specific” protocol produced a 215bp amplicon, which was Sanger sequenced. All the
97 previous HAstVMLB1 (3 samples) and one HAstVMLB2 (sample number 27373) were detected by the
98 conventional protocol. However, one more HAstVMLB2 sample (sample number 27341) was identified.
99 HAstVMLB1 and HAstVMLB2 show >98% similarity with the reference samples described above. The
100 similarity between HAstVMLB2 samples 27373 and 27341 was >99.9%, with only one Aa difference in
101 the RdRp in sample number 27373 (T334A) absent in sample 27341, considering the reference sequence
102 access number KJ807479.1. The RT-PCR amplification using a set of specific primers targeted the ORF2
103 region capsid¹⁰, rendering 449bp amplicons from samples 27373 and 27341. After Sanger nucleotide
104 sequencing and alignment, both samples have shown similarity above 98% with the reference sample
105 access number MK327365.1 from China. HAstVMLB1 was reported for the first time in Brazil in year
106 2015 through a surveillance study involving 2.913 fecal samples collected from children with AGE under
107 5 years old (coastal regions of northeast, southeast and south) (frequency of 0.07%, 2/2913)⁹. Later, in a
108 study involving 483 fecal samples from children with AGE living in the Amazon region (northern
109 region), no non-classic HAstV was detected¹³. In our study using a conventional (“consensus”) RT-PCR
110 protocol, four HAstVMLB1 and one HAstVMLB2 were detected. The HAstVMLB1-3 specific protocol
111 was more sensitive, as after testing one more HAstVMLB2 was detected. We were not able to confirm
112 that the “HAstVMLB1-3 specific” protocol was able to detect HAstVMLB3, due to the unavailability of
113 HAstVMLB3 positive control. A quantitative RT-PCR (qPCR) protocol could be used to detect
114 HAstVMLB3, however, amplicons from HAstVMLB3 positive samples will be required for Sanger
115 sequencing and fully validating this protocol. In fact, the ORF2 amplicons from samples 27373 and
116 27341 were hard to obtain and RT-PCR conditions had to be improved (data not shown). The primers
117 used for “conventional” and “HAstVMLB1-3 specific” protocols were designed based on the nt sequence
118 for RdRp coding (ORF1b), which is conserved among AstV, as otherwise the sequence for capsid
119 proteins (ORF2) is highly variable¹. Indeed, both regions present fundamental characteristics which
120 impart security to the detection and genotyping of the lineages of AstrV, as well gaining access to the

121 diversity of these viruses. Classic HAstV5 has not been circulating in Brazil since 1999 and here this
122 genotype was detected in children with AGE from demarked indigenous areas which are very isolated ⁶.
123 Otherwise, both non-classic AstVMLB2 were detected in children living in Boa Vista, RR state capital.
124 Although the conventional RT-PCR method does not have high sensitivity, it allowed showing the
125 diversity of HAstV that circulate in the Amazon region, reinforcing the need of surveillance. Boa Vista is
126 a gateway for tourists visiting the Amazon rainforest as well and the high circulation could bring new
127 AstrV species.

128

129 *Acknowledgement*

130 The authors acknowledge all children and their parents for making this study possible. Thanks to
131 Professor Dr. José Francisco Luitgards Moura from UFRR, for all his support throughout the Project and
132 for his teachings on indigenous culture. To Bruno Baroni de Moraes e Souza for the English revision and
133 we would like to thank the staff members of “The Fiocruz Institucional Platform for DNA Sequencing
134 (PDTIS)”.

135

136 *Funding*

137 We are grateful for support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel
138 (CAPES) “Programa de Professor Visitante no Exterior-Edital no.01/2019-Processo 88881.337140/2019-
139 01”; The National Council for Scientific and Technological Development–CNPq number424376/2016-4;
140 Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro-FAPERJ “Edital Carlos Chagas Filho”
141 and Oswaldo Cruz Institute-IOC (PAEF).

142

143 *References*

144 1. Méndez E, Arias C. Astrovirus. In: Knipe D, Howley P (eds) Fields Virology, 6th edn. Ippincott
145 Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 609–628. 2013.

146

147 2. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. Clin Microbiol Rev. 2014,

148 <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>.

149

150 3. Krishnan T. Novel human astroviruses: Challenges for developing countries. *Virus Disease*. 2014,
151 <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0202-3>.
152

153 4. Donato C, Vijaykrishna D. The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian
154 Astroviruses. *Viruses*. 2017, <https://doi.org/10.3390/v9050102>.
155

156 5. Leitão GAA, Olivares AIO, Pimenta YC, et al. Human bocavirus 1 and 2 genotypes detected in
157 younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections respectively. *Int J Infect*
158 *Dis*. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.046>.
159

160 6. Moraes MTB, Olivares AIO, Fialho AM, Malta FC, et al. Phenotyping of Lewis and secretor HbGA
161 from saliva and detection of new *FUT2* gene SNPs from young children from the Amazon presenting
162 acute gastroenteritis and respiratory infection. *Infect. Genet. Evol.* 2019,
163 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.011>.
164

165 7. Carvalho-Costa FA, de Assis RMS, Fialho AM, Aratijo IT, et al. The evolving epidemiology of
166 rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®.
167 *BMC Pediatr*. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1415-9>.
168

169 8. Finkbeiner SR, Le BM, Holtz LR, Storch GA, et al. Detection of newly described astrovirus
170 MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis*. 2009, <https://doi.org/10.3201/eid1503.081213>.
171

172 9. Xavier MPTP, Costa FAC, Rocha MS et al. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The
173 First Report of MLB1 Astrovirus. *PLoS One*. 2015, <https://doi:10.1371/journal.pone.0135687>.
174

175 10. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme
176 immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995, [https://doi:10.1128/JCM.33.4.797-](https://doi:10.1128/JCM.33.4.797-801.1995)
177 [801.1995](https://doi:10.1128/JCM.33.4.797-801.1995).
178

- 179 11. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
180 across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
181
- 182 12. Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of
183 mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993,
184 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
185
- 186 13. Siqueira JAM, Oliveira DS, De Carvalho TCN et al. Astrovirus infection in hospitalized children:
187 Molecular, clinical and epidemiological features. J Clin Virol. 2017,
188 <https://doi:10.1016/j.jcv.2017.07.014>.
189
190

Figure 1

A

	279
HAstVMLB1_AB823731.1	MHIKKLRFTLMGSMRSRKYENVYKWCRLINRFVVLPSGEVTAQQRGNPSGQISTMDNMNINYL
Sample_HAstVMLB1_27097S...EVAH...R.....V...I.....L.N.....
HAstVMLB2_KJ807479.1S...EVAH...R.....V...I.....L.N.....
Sample_HAstVMLB2_27373S...EVAH...R.....V...I.....L.N.....AS...II.....
HAstVMLB3_KJ807514.1	L.....S...DVAH.....VH.Y.I.....L.N.....

	400
HAstVMLB1_AB823731.1	QAFYKFLNLPPEEWMHFDLIYGGDRISTYRSIPNEYTKIIVDMYKNVFGMWVK
Sample_HAstVMLB1_27097F.....T.....
HAstVMLB2_KJ807479.1	...F.Y.G...D..I...IV....L...TL.AD..SKV.A...D.....
Sample_HAstVMLB2_27373	...F.Y.G...D..I...IV....L...TL.AD..SKV.A...D.....
HAstVMLB3_KJ807514.1	...F.Y.G...D..I...IV....L...TL.DN.VNQV.N...D.....

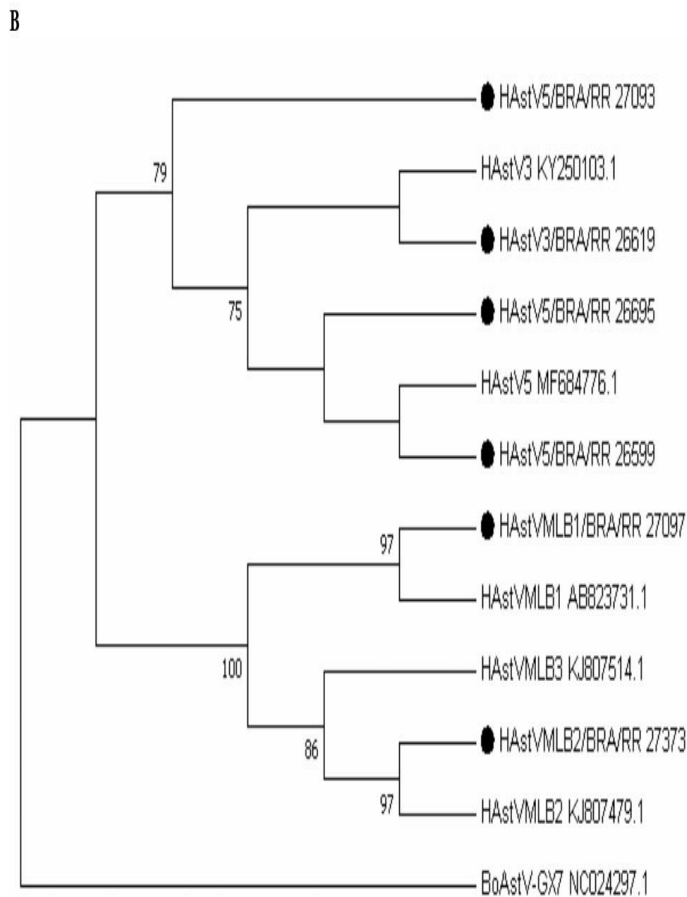


Fig. 1A. Multiple sequence alignment of the amino acids based on partial amino acid sequences (136 aa) from the partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of human astrovirus. The AB823731.1, KJ807479 and KJ807514.1 were accessed from the National Center Biotechnology Information GenBank and used as reference samples.

Fig. 1B. Phylogenetic analysis of astroviruses based on partial amino acid sequences (121 aa) of the partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) from children from Boa Vista, Roraima, Brazil. Sequences were analyzed using the maximum-likelihood method and bootstrap values >70% are shown at the nodes of the tree as percentages based on 2,000 replicates. The strains reported in this study are indicated by filled black circles and the reference strains of astrovirus are shown with their respective GenBank access numbers (legend: HAsV = human astrovirus; BoAstV = bovine astrovirus).

Table 1 Summary of human astrovirus (HAstV) genotypes infecting children from Amazon region detected by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The children from the municipalities live in demarcated indigenous regions, excluding Boa Vista (capital of Roraima state).

Fecal sample number	HAstV type detected	Children municipality (Roraima state)	Age* and Rotarix® (RV1) vaccine status
26599	HuAstV5	Alto Alegre	(04) unvaccinated
26619	HuAstV3	Boa Vista	(04) vaccinated
26683	HuAstVMLB1	Normandia	(04) vaccinated
26695	HuAstV5	Uiramutã	(02) unvaccinated
27093	HuAstV5	Pacairama	(04) vaccinated
27097	HuAstVMLB1	Boa Vista	(04) vaccinated
27215	HuAstVMLB1	Cantá	(04) vaccinated
27341	HuAstVMLB2	Boa Vista	(02) unvaccinated
27361	HuAstVMLB1	Uiramutã	(03) vaccinated
27373	HuAstVMLB2	Boa Vista	(04) vaccinated

Subtitle:* The age each child, being: **1**= ≤3 months old; **2**= >3 months ≤6 months old; **3**= >6 months ≤1 year old; **4**= >1 year ≤2 years old; **5**= >2 years ≤5 years old. For children aged 01 and 05 no HAstV positivity was detected.

Author Agreement

- 1 **Conflict of interest**
- 2 The authors declare there is no conflict of interest.
- 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Perfil da cobertura vacinal RV1 em crianças da região Amazônica atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio.

Todas as crianças que participaram deste estudo e que foram vacinadas para RVA, receberam a vacina Rotarix™, monovalente (RV1) G1P[8]. Nenhuma criança recebeu a vacina RotaTeq™, pentavalente (RV5). A RV1 faz parte do calendário de vacinação do PNI, é uma vacina oral, com o seguinte esquema de vacinação: duas doses, sendo a primeira dose devendo ser administrada a partir de 6 semanas de idade da criança; e a segunda e última dose com um intervalo de pelo menos 4 semanas entre as doses. O esquema de vacinação deve ser administrado preferencialmente antes de 16 semanas, mas pode ser completada até 24 semanas de idade. As crianças prematuras nascidas pelo menos com 27 semanas de gestação podem receber a vacina. Neste estudo foi avaliada a cobertura vacinal de acordo com o Método Rápido de Cobertura (MRC), um método recomendado pela OPAS desde a década de 1980, que vem sendo adotado em vários países das Américas como uma ação rotineira. Caracteriza-se por avaliar a cobertura vacinal a partir da visita em cada domicílio, utilizando como fonte para avaliação da cobertura vacinal a verificação do comprovante de vacinação do indivíduo. É um método bastante útil para avaliação da situação vacinal local. Seus resultados são extremamente importantes para subsidiar a tomada de decisão sobre a definição ou redefinição de estratégias adicionais de vacinação, visando melhorar as coberturas vacinais e sua homogeneidade. O MRC apresenta como principal vantagem mostrar uma cobertura vacinal mais real na área avaliada, uma vez que utiliza a mesma fonte de dados para compor o indicador de cobertura vacinal: o indivíduo participante da entrevista (Brasil, 2012).

A carteira de vacinação de cada criança foi verificada juntamente com uma entrevista (sempre que possível) no momento da coleta das amostras. O percentual de crianças que receberam uma dose da RV1 foi de 21,1% (155/734) e duas doses foi de 40% (293/734). Sendo assim 31% (286/734) das crianças deste estudo receberam pelo menos uma dose e somente 40% duas doses. De acordo com os estudos de fase III da vacina RV1, que incluiu o

Brasil, conforme revisado por Linhares e colaboradores (2006), para a proteção RVA duas doses são necessárias. O protocolo de cálculo monitoramento da cobertura vacinal (“Monitoring of Vaccination Coverage”, MVC), considera somente uma dose para o cálculo, mas é importante ressaltar a importância das duas doses para uma efetiva proteção contra a infecção pelo RVA. Sendo assim na verdade, a cobertura vacinal detectada foi realmente muito baixa (61%), sendo um fato preocupante. Mesmo considerando o cálculo MVC, algumas regiões de RR em que vivem as crianças deste estudo tiveram cobertura vacinal abaixo de 50%; sendo Amajari, Normandia e Alto Alegre que são regiões da floresta Amazônica. No estado de Amazonas e na Venezuela as coberturas foram também muito baixas.

A cobertura vacinal com RV1 foi bem inferior ao recomendado pela meta de 90% (Brasil, 2012). Essa situação é bastante preocupante, em vista do observado, que as frequências para RVA, norovírus e HAdV foram mais altas para aquelas crianças que não receberam nenhuma dose da vacina (Olivares *et al.*, 2020a; submetido). A baixa cobertura vacinal de RV1 provavelmente mantém altas frequências de RVA em ambos os grupos analisados neste estudo (crianças com DDA e sem DDA-grupo controle), porque as crianças não vacinadas com DDA e idade ≤ 3 meses apresentaram uma frequência alta de infecção pelo RVA.

Castelo-Branco e colaboradores (2014) relataram uma baixa cobertura vacinal contra RV1 no estado do Acre em 2014, oito anos após a introdução da RV1 via PNI. Pode ser necessário para essas regiões estudar estratégias de imunização para crianças de 1 mês de idade, pois a maioria das crianças é trazida da floresta amazônica para o HCSA com grande dificuldade, o que representa a dificuldade em chegar nessas regiões as doses vacinais no tempo certo. Interessante ressaltar que as crianças vacinadas foram as mais infectadas com RVA. Além disso, crianças vacinadas entre 6 meses e 2 anos de idade também apresentaram altas frequências de infecção por RVA. Além da baixa cobertura vacinal, fatores como a diversidade dos RVA e a alta frequência de crianças com um perfil genético do HBGA fraco secretor/secretor, também podem ter impactado nos resultados e devem ser investigados. Existe apenas um estudo com crianças com DDA de RR (Soares *et al.*, 2014), com 25 amostras fecais avaliadas e uma taxa de detecção de

RVA de 52% (13/25). Estudos semelhantes relataram uma frequência geral de até 20% de RVA nas crianças da Amazônia brasileira, mas também são encontradas frequências mais altas, conforme relatado no Acre (46%), Amazonas (28,5%), Amapá (38%), Pará (26,3), Rondônia (71,4%) e Roraima (52%) (Orlandi et al., 2006; Neves et al., 2016). As equipes de saúde têm problemas para acessar as regiões onde as crianças vivem; dificultando muito o processo de vacinação. A Amazônia é uma região de grandes desafios, devido à dificuldade de acesso (floresta amazônica) e o estado de Roraima é o local onde vive a maioria das crianças deste estudo, composta por regiões de áreas indígenas demarcadas com cultura própria.

2. Agentes etiológicos virais causadores de doença diarreia aguda e/ou infecção respiratória aguda, detectados em crianças atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio.

Seis diferentes vírus foram investigados nas amostras de fezes das crianças que participaram deste estudo, utilizando as seguintes técnicas: 1. qRT-PCR RVA, norovírus e SaV; 2. qPCR duplex HAdV e HBoV; 3. RT-PCR: HAstV. Embora tenha havido diferença de frequência para alguns destes vírus detectadas nos dois diferentes grupos (crianças com DDA ou com IRA), altas frequências foram detectadas em ambos os grupos (Olivares *et al.*, 2020a, submetido;). O valor de significância (*p value*) calculado foi significativo somente para os norovírus ($p < 0.01$), como já descrito por (Olivares et al. 2020a, submetido; Leitão et al. 2020). Com exceção dos HAdV e HBoV que são agentes etiológicos causadores de DDA e também de IRA, todos os outros vírus são importantes causadores de DDA em crianças de 0 a 5 anos, sendo os RVA e norovírus os principais agentes, causando 400.000 a 500.000 óbitos anualmente no mundo (Tate *et al.*, 2016; Pires *et al.*, 2015). Frequências similares foram detectadas para RVA, HAdV e HBoV para os dois grupos de crianças. Para norovírus e SaV foram detectadas frequências maiores para o grupo de crianças com DDA. O cálculo do valor de *p* para SaV pode ter sido não significativo pelo pequeno número de amostras detectadas. A baixa cobertura vacinal detectada neste estudo, considerando a região onde cada

criança vive, poderia ser uma causa para explicar porque os RVA estariam circulando normalmente na população infantil, estando esta população na faixa de idade da vacinação pelo RVA. A caracterização genotípica dos vírus identificados aqui, com exceção dos HBoV, trará informações importantes para entendermos porque a frequência de infecção nos dois grupos estudados foi igual para a os outros vírus. Uma maior frequência de vírus vacinal RV1 (G1P[8]) no grupo de crianças com IRA e da espécie F grupo de crianças com DDA poderá responder esta questão.

As frequências detectadas para norovírus neste estudo foram superiores a média detectada mundialmente que é de 18% (Ahmed et al., 2014). Neste estudo as frequências foram superiores para o grupo de crianças com DDA (DDA 38%; 184/485) quando comparado ao grupo de crianças controle (IRA 21,3%; 53/249). Embora no grupo de crianças sem DDA a frequência tenha sido menor, mesmo assim ela foi alta e reflete a necessidade de maior atenção, com medidas estratégicas que possam diminuir a circulação dos norovírus, para o qual não há vacina ainda disponível pelo PNI. A circulação dos norovírus na região Amazônica é bastante alta, inclusive está presente nos ambientes nos quais as crianças estão frequentemente expostas conforme foi evidenciado por terem contato com os rios, como foi mostrado por Vieira e colaboradores (2017), evidenciando que os norovírus estão presentes nos rios no período das chuvas. O perfil de sazonalidade detectado para todos os vírus deste estudo aponta um pico maior de detecção para os norovírus, justamente neste período “úmido” do mês de agosto (Olivares et al.2020a, submetido). Nossos dados corroboram os dados de Vieira e colaboradores evidenciando que a presença de norovírus nos rios é um potencial ambiente infeccioso que fez aumentar a infecção neste período do ano.

As frequências detectadas para HAdV foram surpreendentes neste estudo. A alta frequência detectada de HAdV em crianças com IRA (39,5%; 99/249) mostrou que este agente merece atenção especial, levando-se em conta que as IRAs são a primeira causa de morte em crianças de 0 a 5 anos. A frequência maior detectada dos HAdV no grupo de DDA poderia ser explicada pela vacinação RV1, mesmo sendo a cobertura vacinal detectada baixa. Os HAdV podem infectar os tratos respiratório e intestinal, estratégia essa que faz desse vírus um especialista em manter-se nas populações humanas, com alta

diversidade genética e de infecção. O mesmo pode ser dito com relação aos HBoV cuja frequência é praticamente igual (DDA 14,2%; 69/485; IRA 14,1%; 35/249) nos dois grupos de crianças estudadas.

Como descrito previamente, o HCSA atende crianças de toda região Amazônica. Estruturalmente o hospital é adequado, porém sendo o único hospital especializado em atender crianças de 0 a 5 anos do estado de RR; frequentemente há uma grande demanda de crianças com diferentes quadros de doenças e infecções. Portanto a possibilidade dos HAdV e HBoV, os quais fazem infecção por via respiratória e também fecal-oral estarem circulando entre as crianças é totalmente plausível, o que poderia explicar as frequências similares para os dois grupos de crianças (DDA e IRA). Este poderia ser considerado um quadro de infecção hospitalar associado e que não necessariamente seria a realidade do que está acontecendo no ambiente em que vivem as crianças que participaram deste estudo. Como para os HBoV foi possível, durante este estudo realizar a genotipagem, a descrição anteriormente citada pode ter como reflexo o fato de ter sido detectado o HBoV1 causando DDA e HBoV2 causando IRA; embora normalmente ocorra o inverso (Leitão et al., 2020).

Um importante fato a ser considerado com relação à frequência detectada para HBoV foi a alta frequência detectada em crianças vivendo na capital Boa Vista, a qual foi de 49% (51/104). O HBoV tem emergido como um importante causador de DDA conforme revisado por Guido e colaboradores (2016). Embora não tenha havido diferença entre a frequência de HBoV detectada entre crianças RV1 vacinadas e não vacinadas (Leitão et al. 2020), provavelmente o impacto da vacinação para a infecção RVA pode estar relacionada a emergência de outros vírus causadores de DDA, como observado para os norovírus.

3. Diversidade dos astrovírus humanos detectados em crianças que vivem na região Amazônica, atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio.

Cento e setenta amostras negativas para RVA, norovírus, HAdV, HBoV e SaV, foram selecionadas para verificar-se a presença dos HAstV “clássicos” e “não-clássicos”, estes últimos sendo os genótipos de HAstV mais divergentes da família *Astroviridae*. A frequência dos HAstV foi de 5.9% (10/170), sendo muito similar ao descrito anteriormente no Brasil e outros países. Neste estudo, foram identificadas HAstVMLB1 e HAstVMLB2 - “não clássicos”; e HAstV3, HAstV5 - clássicos. Esta é a primeira descrição do HAstVMLB2 no Brasil, observados em duas amostras de fezes de crianças com DDA, em Boa Vista (Olivares *et al.*, 2020b, submetido). O HAstVMLB1 foi relatado pela primeira vez no Brasil no ano de 2015, através de um estudo de vigilância envolvendo 2.913 amostras fecais coletadas de crianças <5 anos de idade (regiões costeiras do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil) (frequência de 0,07%, 2/2913) (Xavier *et al.*, 2015). Posteriormente, em um estudo envolvendo 483 amostras fecais de crianças com DDA residentes na região amazônica, nenhum HAstV não clássico foi detectado (Siqueira *et al.*, 2017a). Não há descrição da circulação do HAstV5 no Brasil desde 1999 e, neste estudo, este genótipo foi detectado em bebês apresentando DDA e vivendo em áreas indígenas demarcadas que são muito isoladas (Moraes *et al.*, 2019). Neste estudo foi possível ser mostrada a diversidade dos HAstV que circulam na região amazônica, reforçando a necessidade de ampliação das ações da vigilância nessa região. Boa Vista é uma porta de entrada para turistas que visitam a floresta amazônica e a alta circulação de pessoas nessa região pode trazer novas espécies de AstrV (Olivares *et al.*, 2020b, submetido).

4. Perfil dos antígenos do grupo histo-sanguíneo (HBGA) das crianças que vivem na região Amazônica, atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio.

4.1. Perfil fenotípico (Secretor e Lewis) e genotípico (gene FUT2) do grupo histo-sanguíneo de crianças atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio.

Noventa e nove por cento (660/734) das crianças que participaram deste estudo, das quais foram coletadas saliva e fezes, em paralelo, vivem no

estado de RR, em diferentes regiões, incluindo a capital Boa Vista e também regiões da floresta Amazônica, principalmente em áreas isoladas do Brasil. Algumas crianças também são do estado do Amazonas, da Venezuela e Guiana. O perfil fenotípico Lewis e secretor do HBGA de todas as 734 crianças (485 apresentando DDA e 249 apresentando IRA) foi definido através da fenotipagem (Moraes *et al.*, 2019; Olivares *et al.*, 2020a, submetido). As informações quanto aos antígenos AB0(H), do grupo sanguíneo foram obtidas das fichas de cada criança.

As primeiras análises para definição dos perfis mostraram que havia uma característica particular, da população de crianças estudadas, que não havia sido descrita anteriormente. O perfil secretor foi prevalente (82,8%, 608/734) e 54,5% das crianças apresentaram o perfil Lewis (a+b+) ou fraco secretor.

O HBGA pode desempenhar um papel direto na infecção, servindo como prováveis receptores e/ou co-receptores de microrganismos, incluindo os vírus. As razões pelas quais as distribuições diferenciais de fenótipos HBGA ocorrem em cada população não são totalmente compreendidas, mas acredita-se que a pressão seletiva imposta pelas infecções e doenças causadas principalmente por microrganismos contribuam para esse processo (De Mattos, 2016). O perfil HBGA foi semelhante para ambos os grupos de crianças (com DDA e com IRA). O grupo de crianças com IRA foi incluído como um grupo controle, porque não havia evidências científicas precisas correlacionando o HBGA a um agente viral para IRA. Para DDA os antígenos Lewis e secretor do HBGA são fatores que determinam a susceptibilidade do hospedeiro para a infecção por RVA e norovírus, como recentemente revisado Sharma e colaboradores (2020) e Nordgren & Svensson (2019), respectivamente. O padrão de susceptibilidade do HBGA do hospedeiro para estes vírus é de uma maneira genotípico-específica e neste estudo não houve possibilidade de serem finalizadas as genotipagens das amostras RVA e norovírus positivas, que pudesse explicar porque ambos os grupos de crianças apresentaram perfil HBGA semelhante. Por exemplo, a circulação de um genótipo que preferencialmente fosse secretor-dependente; uma vez que majoritariamente as crianças são secretoras. A semelhança no perfil HBGA detectado entre os grupos, mostram a importância de definirem-se não só os

agentes causadores das DDA e IRA, mas também os genótipos de cada agente etiológico (Moraes et al., 2019; Nordgren & Svensson, 2019; Sharma et al., 2020; Cantelli et al., 2020a, 2020b).

O perfil Le (a+b+), também conhecido como fraco secretor, é principalmente detectado na população asiática (Daniels, 2013) e foi um resultado inesperado a detecção desse perfil na população das crianças que vivem na região Amazônica. Visando confirmar este perfil o único SNP responsável até o momento conhecido por modificar a conformação do antígeno Lewis, localizado no gene *FUT2*, foi verificado para um percentual representativo de amostras de DNA obtidas a partir da saliva das crianças envolvidas neste estudo (Moraes et al., 2019). Os SNP rs1047781 (fraco secretor) e rs601338 (não secretor) (Kelly et al., 1995; Ferrer-Admetlla et al., 2009), não foram detectados. A detecção do SNP rs601338 seria uma evidência de que o *status* fraco secretor das crianças é somente transitório, mas não foi detectado também este SNP nas crianças Le (a+b+). Talvez o mais importante a ser considerado seja a flutuação natural desse antígeno durante os primeiros meses de vida de uma criança. Os recém-nascidos são fenotipados como Le (a-b-) nos primeiros meses de vida, pois a produção da enzima *FUT2* é muito baixa. Se estas crianças forem secretoras, geneticamente, logo depois serão fenotipadas como Le (a+b-) e depois por serem secretoras irá converter o seu fenótipo Lewis para um *status* definitivo (Lea-b+). A grande questão é que durante este período de transição entre Le (a+b-) para Le (a-b+), um perfil Le(a+b+) pode ser detectado (transitoriamente). Até um ano de idade somente 50% das crianças terão o fenótipo definitivo e só aos dois anos de idade é que estas crianças terão um fenótipo Lewis que realmente reflete o determinado geneticamente pelos genes *FUT2* e *FUT3* (Combs, 2009; Oriol, 1995; Lawler, 1961). Outro fato importante a ser considerado é que não existem estudos suficientes que possam afirmar que este seria o único SNP no gene *FUT2* causador deste perfil. A enzima *FUT2* pode ser regulada de várias formas, incluindo polimorfismos genéticos ainda não descritos, que podem explicar por que Lewis a e Lewis b podem estar presentes ao mesmo tempo (De Mattos, 2016). Por outro lado, o aleitamento materno também é outro fator a ser considerado na detecção do perfil Le (a+b+), pois os açúcares da mãe, durante o aleitamento pode ser passado para seus filhos pelo leite (Tonon et al., 2019).

A alta frequência do perfil fraco secretor detectado nas crianças deste estudo é o perfil também detectado da maioria das populações mundiais, é em torno de 10 a 20% (Daniels, 2013). O perfil fraco secretor associado à SNPs do gene *FUT2* por Moraes e colaboradores (2019), levou a estabelecer a hipótese de que existe uma proximidade que é refletida no perfil HBGA, avaliado durante este estudo, entre a população de crianças da região Amazônica (de etnia indígena) e a população asiática, o que corroboraria a teoria de povoamento das Américas via ilhas polinésias pelo povo asiático até alcançar o Brasil.

4.2. Susceptibilidade genética associada aos antígenos do grupo histo sanguíneo e aos rotavírus A, norovírus e adenovírus humanos.

Neste estudo não foi observada nenhuma diferença quanto à frequência de infecção para RVA e norovírus que pudesse ser interpretada como um fator de susceptibilidade do hospedeiro ao HBGA, pois os valores de frequência ficaram igualmente distribuídos entre os diferentes grupos de crianças com DDA e IRA, com ou sem infecção viral (RVA e norovírus) detectada. Tem sido descrito que a avaliação do perfil de susceptibilidade deve ser para estes vírus via genótipo (Nordgren & Svensson, 2019; Sharma et al., 2020). Além disso, numa população em que o perfil secretor foi prevalente (82,8%, 608/734) (Olivares et al. 2020a, submetido), torna-se ainda mais difícil diferenciar indivíduos susceptíveis de não-susceptíveis, sendo necessário um número amostral maior e muito aquém do que seria possível num estudo amostral simples e sem coorte. Cinquenta e quatro por cento das crianças desse estudo apresentaram o perfil Lewis (a+b+) ou fraco secretor; e também para este grupo de crianças, com este fenótipo diferenciado, não houve diferença entre os grupos (DDA e IRA) para RVA e norovírus. Entretanto, foi observado um percentual surpreendente de crianças Le (a+b+) (fracos secretores) infectadas pelos HAdV e apresentando IRA (DDA 16,9%, 82/485; IRA 24,9%, 62/249). Este resultado é bastante importante, pois foi representativo num percentual alto de crianças Le (a+b+) (*odds rate* 0.67, intervalo de confiança 0.50, sendo representativo < 1). A fenotipagem foi o único critério avaliado neste caso. É fundamental entender a base genética do perfil Le (a+b+) da população de

estudo que vive na região Norte do Brasil, que talvez possa explicar essa susceptibilidade particular das crianças à IRA por HAdV.

Quanto ao antígeno AB0 também somente foi representativo (*odds rate* 0.88 intervalo de confiança 0.55, sendo representativo < 1) para os HAdV, ou seja, crianças com o grupo sanguíneo 0 foram mais susceptíveis a IRA por HAdV (DDA 30%, 148/485; IRA 34,5%, 86/249). Os primeiros estudos de susceptibilidade AB0 (H), Lewis e Secretor, surgiram há mais de 70 anos e continuam sendo objeto de estudo de diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo, que estudam os fatores/antígenos do hospedeiro que na maioria das vezes funcionam como receptores e co-receptores para várias infecções, inclusive viral. Shedden & Potter (1964) publicaram um estudo comparativo, num momento da ciência em que a palavra “susceptibilidade” não tinha o peso das recentes descobertas neste campo de estudo e que agora passam a ter outro valor. Esses autores verificaram que a incidência de infecção pelo vírus da influenza foi significativamente maior em indivíduos militares (adultos) do grupo O do que em indivíduos do grupo A. Para HAdV, ocorreu o contrário; mais indivíduos infectados de grupo A do que O; com base nesses achados, os autores propuseram que a susceptibilidade do grupo analisado poderia ser resultado de uma falha adquirida de anticorpos na infância devido a serem estes indivíduos mais resistentes.

Neste estudo, foram avaliadas crianças de 0 a 5 anos e, baseado no conceito de que os HBGA tem um perfil de expressão dinâmico (transitório), a susceptibilidade genética as infecções virais deve ser avaliada, levando-se em consideração a idade do indivíduo infectado.

4.3. Diversidade do gene FUT3 das crianças investigadas neste estudo

Verificamos a presença dos cinco principais SNPs do gene *FUT3* em crianças fenotipadas como Le (a-b-) por sequenciamento nucleotídico de DNA da saliva. Adjacente aos cinco principais SNPs, 9 novas mutações foram detectadas. Essas novas mutações poderiam explicar o fenótipo Le (a-b-), especialmente a mutação 1011C>G, devido à sua alta frequência e porque uma criança fenotipada como Le (a-b-) apresentou apenas essa mutação. Estudos futuros podem confirmar esta hipótese, os quais devem incluir o

sequenciamento de amostras de controle de outros HBGA fenótipos diferentes de Le (a-b-). O perfil do gene SNPs de crianças da região amazônica detectado foi principalmente o haplótipo $le^{59/508}$, mostrando alguma proximidade genética entre indivíduos nativos da Ásia e da Amazônia, conforme identificado neste estudo (Moraes et al., 2019).

PERSPECTIVAS

As perspectivas deste estudo surgem principalmente de necessidade de obterem-se os resultados de genotipagem dos vírus aqui identificados como causadores de DDA e IRA, a saber: RVA, norovírus, HAdV e sapovírus. Relacionar os diferentes genótipos identificados com o perfil de susceptibilidade ABO, Lewis e secretor das crianças. Uma análise mais completa quanto aos SNPs dos genes *FUT2* e *FUT3* (genotipagem do HBGA) trará uma gama de informações que certamente irão influenciar em futuras decisões para introdução de uma vacina para prevenir a infecção pelos norovírus e também monitoramento da vacina RV1 e da infecção pelos RVA.

Considerando que são poucos os dados disponíveis na literatura que relacionam o perfil HBGA com os diferentes genótipos de SaV, sendo também grande a importância tratando-se de um vírus emergente causador de DDA e da mesma família dos norovírus (*Caliciviridae*).

CONCLUSÕES

- A frequência das infecções de RVA, SaV, HBoV e principalmente para os norovírus e HAdV em crianças com DDA, demonstram a importância da etiologia viral nas DDA em crianças de até 5 anos de idade atendidas no HCSA de Boa Vista, RR no período do estudo e podem estar relacionadas ao fator de susceptibilidade ao HBGA (incluindo a heterogeneidade genética) e a baixa cobertura de RV1;
- A frequência das infecções por DDA detectadas para norovírus foram elevadas (38%, 184/485) quando comparadas a estudos realizados no Brasil e outros países, evidenciando a necessidade de propor estratégias para controlar a circulação dos norovírus na região Amazônica;
- A elevada frequência detectada para HAdV (39,7%, 99/249) em crianças com IRA neste estudo demonstra o impacto destes vírus nas IRA em crianças até cinco anos de idade da região Amazônica;
- Neste estudo foram detectadas frequências similares para HAdV (DDA 33,6%, 163/485; IRA 39,7%, 99/249) e HBoV (DDA 14,2%, 69/485; IRA 14,1%, 35/249), ambos vírus relacionados à etiologia das DDA e IRA e nos leva a propor a hipótese de que existam problemas de manejo de pacientes e de estrutura física no HCSA, permitindo a infecção cruzada de agentes etiológicos destas duas síndromes;
- O HBoV genótipo 1 foi o único detectado causando DDA em crianças na região Amazônica; inversamente o HBoV genótipo 2 do HBoV foi associado à IRA; diferindo de estudos de outras regiões brasileiras e de outros países e pode estar ligada a um fator de susceptibilidade existente nas crianças da região Amazônica;
- Os astrovírus clássicos e não clássicos foram detectados como agentes etiológicos de DDA em crianças em Boa Vista e de áreas indígenas,

evidenciando a necessidade de uma vigilância ativa de DDA na região, por ser esta a porta de entrada de turistas e garimpeiros na Amazônia;

- As crianças da Amazônia apresentaram neste estudo um perfil fenotípico secretor e Lewis HBGA e SNPs do gene *FUT2* e *FUT3*, semelhantes aos descritos na população asiática, principalmente de tribos indígenas não havendo diferença para o perfil encontrado em crianças com DDA e IRA;
- Neste estudo foi demonstrado que o alto percentual de crianças fracasecretoras quanto ao HBGA é um fator importante para ter sido detectadas altas frequências de HAdV;
- Neste estudo não foi verificada nenhuma diferença quanto à frequência de infecção para RVA e norovírus e perfil fenotípico (secretor e Lewis) que pudesse ser identificada como um fator de susceptibilidade do hospedeiro ao HBGA;
- A semelhança no perfil HBGA detectado entre os grupos com DDA e IRA, mostram a importância de definir-se não só os agentes causadores das DDA e IRA, mas também os genótipos de cada agente etiológico.

Anexo I: Publicação obtida durante o doutoramento em colaboração diretamente relacionada aos objetivos da tese.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

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

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



Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{a,*}, Alberto Ignácio Olivares Olivares^{b,c}, Alexandre Madi Fialho^a, Fábio Correia Malta^a, Sergio da Silva e Mouta Junior^a, Romanul de Souza Bispo^b, Alvaro Jorge Velloso^d, Gabriel Azevedo Alves Leitão^a, Carina Pacheco Cantelli^{c,d}, Johan Nordgren^e, Lennart Svenson^e, Marize Pereira Miagostovich^a, José Paulo Gagliardi Leite^a

^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Federal University of Roraima, Research Center Roraima Health Observatory (ObservaRR), Avenida Capitão Ene Garcês, 2413-Aeroporto, Boa Vista, RR, Brazil

^c Post-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Department of Viral Vaccines and Department of Quality Control, Immunobiological Technology Institute (BioManguinhos) – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, 581 85 Linköping, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Histo-blood group antigens
Saliva, weak secretor
Single nucleotide polymorphisms
Amazon

ABSTRACT

The Histo-blood group antigens (HBGA) are host genetic factors associated with susceptibility to rotavirus (RV) and human norovirus (HuNoV), the major etiological agents of viral acute gastroenteritis (AGE) worldwide. The *FUT2* gene expressing the alpha-1, 2-L-fucosyltransferase enzyme is important for gut HBGA expression, and also provides a composition of the phenotypic profile achieved through mutations occurring in populations with different evolutionary histories; as such, it can be considered a genetic population marker. In this study, Lewis and secretor HBGA phenotyping was performed using 352 saliva samples collected from children between three months and five years old born in the Amazon (Brazil, Venezuela and English Guyana) presenting AGE or acute respiratory infection (ARI), the latter considered as control samples. The total of children phenotyped as secretors was 323, corresponding to 91.80%. From these, 207 (58.80%) had a Le (a + b+) profile. The HBGA profiles were equally found in children with AGE as well as with ARI. The rs1047781 of the *FUT2* gene was not detected in DNA from saliva cells with a Le (a + b+) profile. However, mutations not yet described in the *FUT2* gene were observed: missense 325A > T, 501C > T, 585C > T, 855A > T and missense substitutions 327C > T [S (Ser) > C (Cys)], 446 T > C [L(Leu) > P(Pro)], 723C > A [N(Asn) > K(Lys)], 724A > T [I(Ile) > F(Phe)], 736C > A [H(His) > N(Asn)]. The SNP distribution in the *FUT2* gene of the analyzed samples was very similar to that described in Asian populations, including indigenous tribes.

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), acute gastroenteritis (AGE) is the second leading cause of death in children under five years, provoking around 525,000 deaths each year (WHO, 2017). Pathogens including parasites and bacteria are responsible for AGE, but viruses such as rotavirus A (RVA) and human norovirus (HuNoV), are also important etiological agents (Monedero et al., 2018; Munnink and

van der Hoek, 2016). The Histo-blood group antigens (HBGA) comprising ABO, Hh, secretor and Lewis systems are important factors in host susceptibility to enteropathogenic infections (Cooling, 2015; Almand et al., 2017; Ramani et al., 2016). The HBGAs are not only expressed in red blood cells (RBC), but are also present in many tissues, such as the intestine, and bodily secretions such as saliva (Daniels, 2013). The presence of H antigens (secretion) in saliva is governed by the *FUT2* gene encoding an alpha-1, 2-L-fucosyltransferase enzyme.

* Corresponding author.

E-mail address: baroni@ioc.fiocruz.br (M.T.B. de Moraes).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.011>

Received 23 November 2018; Received in revised form 16 January 2019; Accepted 13 February 2019

Available online 18 February 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Individuals who secrete A or B antigens also secrete H antigens. Non-secretors have a non-functional FUT enzyme, and so do not secrete those antigens even though they are expressed in their RBC.

The Lewis system consists of two major antigens, and three common phenotypes: Le(a – b –), Le(a + b –), and Le(a – b +). The Lewis determinants are oligosaccharides which are synthesized by the sequential addition of sugar units to oligosaccharide chains by fucosyltransferases previously described and encoded by *FUT1* and *FUT2* genes; and by alpha-(1,3/1,4)-fucosyltransferases encoded by the *FUT3* (Lewis) gene. The type 2 oligosaccharide chains are expressed mainly in erythrocytes and in vascular endothelial cells, while the type 1 oligosaccharide chains are expressed in the digestive and respiratory tracts and in secretions (Koda et al., 2001). The *FUT2* gene has significant polymorphism with ethnic specificity and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported (Ferrer-Admetlla et al., 2009). The main rs601338 was described by Kelly et al. (1995) conferring a non-secretory phenotype for the individuals carrying the nonsense mutation. The rs1047781SNP corresponds to a missense mutation commonly found in Asian populations (Cooling, 2015) and homozygous carriers of this mutation are considered weak secretors, leading to low levels of alpha-1, 2-L- fucosyltransferase enzymes and the Le(a + b +) phenotype. A multiplicity of research approaches including genetic analyses have been used to study the ancient settlement of individuals in the American continent (Ruiz-Linares, 2015). The major question is the route of entry of the initial settlers. This central question has been approached with variable degrees of success using various types of genetic markers examined in native populations. The first studies used information from blood groups and proteins (Cavalli-Sforza et al., 1994), after Chang et al. (2002) proposed that the mutations or polymorphisms of the *FUT2* gene would be important markers and could be useful for investigating population genetics. There are few studies in Brazil which highlight the *FUT2* gene as a genetic marker, despite being a country of great proportions and with a high ethnical diversity; one of these few was presented by Vicentini et al., 2013. This study involved a black population from Southeastern Brazil, descendants of former African slaves, who were infected with HuNoV; living in semi-isolated communities called “Quilombola Communities”.

The aim of this study was to characterize the Lewis and secretor HBGA from saliva obtained from young children with AGE and ARI (control population) living in the Amazon. We also want to elucidate the hypothesis that the population of indigenous ethnicity presents genetic HBGA markers related with the Asian population by comparing our data from *FUT2* gene SNPs found in the saliva of these young children from the Amazon with those already detected in Asian populations.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement and study population

This study was approved by the Federal University of Roraima Ethical Research Committee (CEP N°: 1.333.480 from November 23, 2015), whose main objective is to identify enteropathogens causing gastroenteritis in children living in the Amazon. The Amazon is comprised of the International Amazon (Brazil, Bolivia, Peru, Ecuador, Colombia, Venezuela, English Guyana, French Guyana and Suriname), the Northern region and the Brazilian Legal Amazon or Brazilian Amazon (Fig. 1). All children included here received emergency medical assistance when attended at Santo Antonio Hospital in the city of Roraima. The Santo Antonio Hospital exclusively attended children up to 12 years of age from the city of Boa Vista (RR state) or from demarcated indigenous areas, including the Amazon rainforest. Different ethnic groups live in the demarcated indigenous areas, but the ethnic group in which the children from this study live, declared by their parents, does not necessarily represent their pure ethnicity. However, there is a real ancestry denoted by physical and cultural aspects. The

clinical samples were collected after an informed consent form was signed by the parents or guardians of the children attended. Two groups of children up to five years old presenting acute gastroenteritis (AGE) or acute respiratory infection (ARI) were included in this study, the latter as a control population.

2.2. Collection and processing of saliva samples

From January 2016 to April 2017, saliva samples and epithelial cells were collected from each child using a CHEMBIO® saliva oral swab device, reference number 25-1616 (Medford, NY, USA). The tubes containing collected saliva samples were kept at –20 °C until the moment of processing. For processing, 1.2 mL of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, were added to each tube containing the collected saliva, followed by a vigorous vortex, and the total volume (about 1 mL) was then transferred to a new tube. The tubes containing the 1:5 diluted saliva were maintained at –20 °C and used in Enzyme Immunoassay tests (EIA) and total genomic DNA extraction.

2.3. Enzyme immunoassay test to detect A, B, Le^a and Le^b antigens

This EIA was performed as previously described by Nordgren et al. (2014) with adjustments. Each saliva sample previously processed was diluted 1:100 in 100 µL of 0.1 M pH 9.6 carbonate bicarbonate buffer and used to coat each well of a NUNC plate 96F (Maxisorp®; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark). The plate was initially incubated for 2 h at 37 °C, followed by overnight incubation at 4 °C, and the next day the plate was washed 4 times with PBST (PBS containing 0.05% of tween 20). For each group of four wells coated with the same saliva sample, 100 µL of one of the four mAb were applied, a different one in each well, those being: 1) -anti-A (ABO1 clone 9113D10); 2) -anti-B (ABO2 clone 9621A8), both from Diagast®, Loos Cedex, France; 3) -anti-Le^a (LE1 clone LEA2, Seraclone); 4) -anti-Le^b (LE2 clone LM129/181, DiaClon), both from Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA. The anti-A, anti-Le^a and anti-Le^b mAbs were diluted 1:5000 and the anti-B mAb were diluted 1:1000 in PBST containing 5% of fetal bovine serum (FBS). The plate was incubated for 1 h and 30 min at 37 °C, washed as described previously, then a 1:3000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (heavy plus light chain) (Promega Corporation®, Madison, USA) was added, and the plate was incubated for another 1 h and 30 min at 37 °C. With the plate washed again four times, the reaction was developed using 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Systems (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) and stopped by addition of 2 M H₂SO₄. For each plate containing saliva samples, the following control saliva samples were included: *profile 1* = Le (a-b) *profile 2* = Le (a-b +) and *profile 3* = Le (a + b-). These control saliva samples were obtained from adult donors born in the state of Rio de Janeiro, Brazil (The Oswaldo Cruz Foundation Ethical Research Committee - CEP/Fiocruz number 311/2006). All the saliva samples were evaluated in duplicate and the plate was read at 450 nm in a spectrophotometer. The cutoff value was twice the mean level of blank control (PBST containing 5% of FBS) and conjugate control (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG diluted in PBST containing 5% of FBS).

2.4. Enzyme immunoassay to detect Fucal-2Gal-R

Le (a-b) saliva samples (did not react to either mAb anti-Le^a or Le^b) were tested for detection of *Fucal-2Gal-R*, using a lectin based EIA, according to Nordgren et al. (2014) and using saliva samples diluted 1:500. All the saliva samples were evaluated in duplicate, using control saliva samples and cut-off values as described.

2.5. Titration of Le^a Seraclone antibody

A titration of LE1 Le^a mAb was performed using 1:500, 1:1000,



Fig. 1. Map of the Amazon obtained from <http://portalparamazonia.blogspot.com/2016/01/amazonia-legal-e-internacional.html> with minor modifications. -Surrounded by a yellow line: Northern region; -Light green: Brazilian Legal Amazon or Brazilian Amazon including the Brazilian states of Mato Grosso (MT), Tocantins (TO) and half of Maranhão (MA); -Dark green: International Amazon, including Brazil (60% of this area), Bolivia, Peru, Ecuador, Colombia, Venezuela, English Guyana, French Guyana and Suriname. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 and 1:10000 dilutions. The Le^b, Le^a, and control saliva samples as described were used, as well as six samples from children from the Amazon. All the saliva samples were evaluated in duplicate and the plate was read at 450 nm in a spectrophotometer (BioTek, Vermont, USA). The cutoff value was twice the mean level of the blank and conjugate control samples.

2.6. Total genomic DNA extraction from saliva

Total genomic DNA was extracted from a volume of 200 µL from each saliva sample collected from children phenotyped as Le(a + b+) and control saliva samples as described in item 2.3. The original Boom *et al.* (1990) method was used with minor modifications (da Silva *et al.*, 2015). Five microliters of the total genomic DNA eluted with 50 µL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) were used in the touchdown PCR (TD-PCR).

2.7. Touchdown PCR and nucleotide sequencing

The PCR amplicons were obtained by TD-PCR from DNA extracted from children phenotyped as Le(a + b+) and control saliva samples, using primers as described by Bucardo *et al.* (2009) for the coding and 3' untranslated regions of the *FUT2* gene. The Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity enzyme was used for amplification according to the manufacturer's recommendations (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). TD-PCR was carried out according to the touchdown parameters: 65 °C -55 °C (annealing), 26 + 19 (cycles) and 68 °C (elongation). The primers were also used to detect the 385A > T SNP

and other SNPs by nucleotide sequencing. After the TD-PCR, the amplicons were purified using Wizard PCR Prep Columns[®] according to the manufacturer's recommendations (Promega, Madison, WA, USA) and sequenced using an ABI Prism BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit[®] and ABI Prism 3730 Genetic Analyser[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The chromatograms and *FUT2* gene encoding nucleotide sequences were analyzed using the free tracer viewer Chromas 2.4[®] (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, QLD, AUS). Nucleotide and amino acid multiple alignments were done using the Mega -Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 software (Kumar *et al.*, 2016) on results from saliva samples, control samples and the U17894.1 reference sequence described by Kelly *et al.* (1995), obtained from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The *FUT2* gene SNPs identified so far were accessed through the NCBI database of SNPs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

2.8. Statistical analysis of data

We considered the 2010 census of the population of infants aged up to five years in the state of Roraima performed by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), which corresponded to 47,603 children under the age of five. The sample estimate for this population size, with a margin of error (ME) of 5.2%, was approximately 353 children, from which 352 saliva samples were analyzed in this study. A 95% confidence level was assumed. Bioestat software version 5.3 (www.mamiraua.org.br) was used for statistical analysis.

Table 1

Data from the study population and number of saliva samples collected; 1. Municipality name is the region of origin of each child attended; 2. N = Total number of saliva samples collected; (%) = per cent of the total number of total saliva samples collected; 3. Ethnic group corresponds to the group of individuals that lives in that particular region to which the children belong to.

Municipality name ^a	N (%)	Ethnic group
Alto Alegre	40(11.36)	Macuxi, Wapixana and Yanomami
Amajari	20(5.68)	Macuxi, Wapixana and Yanomami
Amazonas (AM)	7(1.99)	Yanomami
Boa Vista	179(50.85)	Macuxi, Wapixana and Taurepangue
Bonfim	10(2.84)	Macuxi and Wapixana
Cantá	10(2.84)	Wapixana
Caracaraí	4(1.14)	Yanomami
Caroebe	1(0.28)	Wai-Wai
English Guyana	4(1.14)	Macuxi and Wapixana
Iracema	4(1.14)	Yanomami
Mucujái	8(2.27)	Yanomami
Normandia	7(1.99)	Macuxi, Wapixana and Ingarincó
Pacaraima	8(2.27)	Macuxi, Wapixana and Taurepangue
Rorainópolis	6(1.70)	Waimirim and Afroari
São Luiz do Anauá	1(0.28)	Wai-Wai
Uiramutã	29(8.23)	Macuxi, Wapixana and Ingarincó
Venezuela	14(4.00)	Taurepangue (Pemon ^b) and Macuxi
Total	352(100.00)	

^a All the municipalities are located in the state of Roraima(RR), except Amazonas that corresponds to the state of Amazonas (AM) and the countries English Guyana and Venezuela.

^b The Taurepang self-designate Pemon, a term that means “people”.

3. Results

Saliva samples were collected from 352 children (one sample/child) aged between three months and five years old, these being 192 boys and 160 girls. Two hundred and thirty-two children (66%) presented AGE and 120 (34%) presented ARI. Table 1 shows the region of origin of each child attended, number of samples collected and their ethnic group.

3.1. HBGA phenotype detected in saliva samples from young Amazonian children

A quality verification step of the mAb used to determine the HBGA phenotype was performed with a small number of saliva samples (n = 60), evaluated by EIA to detect A, B, Le^a and Le^b antigens exactly as described by Nordgren et al. (2014), including the dilution of mAb as defined by those authors. The positivity profile for the A, B, AB or O antigens in the saliva from the children in this study was as follows: O = 221 (63%); A = 65 (18%); B = 15 (4%) and AB = 51 (15%). Most of the 207 samples phenotyped as Le (a + b+) were phenotyped as “0”. > 50% of the saliva samples presented high absorbance values for anti-Le^a and anti-Le^b mAbs simultaneously. To check for the possibility of cross reactivity between the anti-Le^a and anti-Le^b mAb, a titration of the anti-Le^a mAb was performed (Seraclone®). Saliva controls (profile 1, 2 and 3) and anti-Le^b mAb were included in the titration. The endpoint titer was 1:5000 (Fig. 2).

Three hundred fifty-two saliva samples were evaluated to define the Lewis and secretor HBGA profile as shown in Table 2. Remarkably, 207 saliva samples (58.80%) were phenotyped as Le(a + b+). Seventy-three saliva samples (20.60%) were phenotyped as Le(a-b+) and eighteen (5.0%) as Le(a + b-). The saliva samples collected from fifty-five (15.60%) children did not react with anti-Le^a or Le^b (a-b-) mAb and were considered undetermined concerning the secretor phenotype and Lewis negative.

To define the total of children with a secretor profile, we performed the EIA test to detect *Fuca1-2Gal-R* with the fifty-five undetermined saliva samples (Table 2). Eleven saliva samples presented absorbance value below cutoff values (negative samples) and 26 samples above

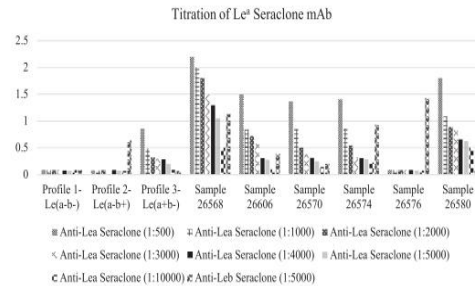


Fig. 2. Graphic of the anti-Le mAb titration(a): The graphic demonstrates the titration result of the LE1 anti- Le(a) mAb from Seraclone (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). The “y” axis corresponds to absorbance values for each sample evaluated with a different dilution of anti-Le(a) mAb and anti-Le (b) mAb (the anti-Le(a) mAb was included as a control antibody). Positive samples are presenting absorbance values above 0,190, according to the cutoff test.

Table 2

Final result of the HBGA phenotyping: Secretor phenotype results defined by detection of the *Fuca1-2Gal-R* in the 352 saliva samples collected from children from the Amazon. This Table also shows the secretor and Lewis HBGA phenotypes for each group of saliva samples collected from children with AGE or ARI. A, B or O antigens were detected by EIA in saliva.

Secretor and non-secretor profile	N total (%) samples collected from children with		N total (%) profile
	AGE	ARI	
Le(a + b +) secretor	135(58.10)	72(60.00)	207 (58.80)
Le(a-b +) secretor	49(21.10)	23 (19,20)	72 (20.50)
Le(a-b-) secretor	31(13.30)	13(10,80)	44(12.50)
Le(a + b-) non-secretor	9(4,00)	9(7,50)	18(5.10)
Le(a-b-) non-secretor	8 (3,50)	3(2,50)	11(3.10)
Total	nnnn(100.00)	120 (100.00)	352(100.00)

(positive samples). Samples with absorbance values considered borderline (10% below or above cut off values) were re-tested. At the end, a total of 323 (91.80%) secretor children (including samples phenotyped as Se^m) from the Amazon and 29 (8.2%) non-secretors were found.

3.2. FUT2 SNPs detected in young Amazonian children

From the 207 saliva samples collected from children phenotyped as Le(a + b+), 166 continuous sequences (contigs) of the coding region and the 3’ untranslated regions of the *FUT2* gene were obtained by TD-PCR (80.20%). Table 3 shows all the SNPs detected including some not yet described for the *FUT2* gene (written in bold). The SNPs were classified by frequency of detected SNPs in low, medium and high; according, respectively, to the occurrence of the SNPs in ≥ 1 to ≤ 10%, ≥ 11 to ≤ 60% and ≥ 61 to ≤ 93% of DNA sequences from Le (a + b+) children. This criterion shows that the rs281377 was detected in DNA from all children phenotyped as Le (a + b+), except in children from the Iracema Municipality. The Le (a + b+) phenotype and *FUT2* gene SNPs were distributed amongst the municipalities together with other Lewis and secretor HBGA phenotypes, except for Iracema, from which all four saliva samples analyzed were phenotyped as Le (a + b+) (Table 1). Two SNPs in the 3’ untranslated region of the *FUT2* gene were detected with high frequency in the DNA sequences analyzed but not in the rs485073 and rs603985 control samples. However, the Iracema municipality did not present the rs485073 (Table 3). The rs1047781 SNP was not detected in any of the DNA sequences analyzed from children phenotyped as Le (a + b+).

Table 3

SNPs detected in the DNA sequences from children phenotyped as Le(a+b+): The municipality of the children is indicated, as well as the substitution of the nucleotide (SNP), amino acid (AA) or no AA (None) for the indicated position. Letters in bold highlight the SNPs not yet described (new) in the *FUT2* gene. The table presents the Blood group antigen Gene MUTation (BGMUT) database (www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut) and NCBI-SNP (within parentheses) nomenclatures for the SNP position. The substitutions are indicated using the NCBI-SNP nomenclature.

Position and substitution	Frequency detected in DNA sequences from Le(a + b +) secretor children from different municipalities (high, medium and low)	
SNP	AA	
40 A > G (rs1800021)	I(Ile) > V(Val)	(Low) Boa Vista
113 C > T (rs114018037)	A(Ala) > V(Val)	(Low) Boa Vista
216 C > T (rs681343)	None	(High) Boa Vista, Iracema
325 A > T (new)	None	(High) Boa Vista Iracema, English Guyana and Venezuela
327 C > T (new)	S(Ser) > C(Cys)	(High) Boa Vista Iracema, English Guyana and Venezuela
357 C > T (rs281377)	None	(High) All municipalities, Venezuela and English Guyana, except from Iracema
446 T > C (new)	L(Leu) > P(Pro)	(Low) Boa Vista, Normandia
480 C > T (rs1800027)	None	(Low) Boa Vista
501 C > T (new)	None	(Low) Normandia
519 C > A (rs748593261)	None	(Low) Boa Vista
585 C > T (new)	None	(Low) Boa Vista
685 G > T (rs375360260)	V(Val) > L(Leu)	(High) Boa Vista
723 C > A (new)	N(Asn) > K(Lys)	(High) Iracema and Boa Vista
724 A > T (new)	I(Ile) > F(Phe)	(High) Iracema and Boa Vista
736 C > A (new)	H(His) > N(Asn)	(Low) Alto Alegre
739 G > A (rs602662)	G(Gly) > S(Ser)	(Low) Iracema
855 A > T (new)	None	(Medium) Venezuela
960 A > G (rs485186)	None	(Medium) Boa Vista, Normandia
1009 A > G (rs485073)	None	(High) All municipalities except from Iracema
1011 T > C (rs603985)	None	(High) All municipalities

3.3. *FUT2* gene SNPs from the saliva of young Amazonian children as population markers

Comparing Quilombola descendants with the children studied, only the rs281377 was common to both groups. On the other hand, the rs281377, rs1800027, rs375360260 and rs602662 located in the coding region and the rs485073 and rs603985 located in the 3' untranslated region of the *FUT2* gene, were both common to Asian individuals and children from the Amazon.

4. Discussion

HBGA can play a direct role in infection by serving as receptors and/or coreceptors for microorganisms, parasites, and viruses. Therefore, it is important to study the HBGA profiles in populations (Monedero et al., 2018; Cooling, 2015). The reasons why the differential distributions of HBGA phenotypes occurs at a populational level are not fully understood but it is believed that selective pressure imposed by disease-causing microorganisms contributed to this process (De Mattos, 2016). Children from the Amazon presenting AGE between 3 months and 5 years old were enrolled in this phenotyping and children presenting ARI were considered as control. The HBGA profile detected was similar in both groups. AGE is caused by a variety of pathogens including parasites, bacteria, and enteric viruses. Lewis and secretor HBGA antigens are host susceptibility factors for infection by HuNoVs and RVA since these antigens serve as a viral attachment factor in the gastrointestinal tract. The association of HBGA with ARI is restricted to some initial reports as reviewed by Cooling (2015). So far, there have been no reports strongly correlating HBGA to a viral agent for ARI. However, it is important to consider the high percentage of young children presenting an ARI diagnosis and a Le(a + b +) profile. The similarity in the HBGA profile detected between the groups show the importance of defining the specific pathogen agents responsible for each one of the infectious diseases (Thorne et al., 2018).

The Le(a + b +) HBGA profile was prevalent in younger children from the Amazon. The Le(a) mAb reaction was very strong, similarly as seen with the Asian population (Cutbush et al., 1956; Fung et al., 2014). We considered that the LE1 Le(a) mAb have detected the Le(a) antigen in 207 saliva samples, which corresponds to 58.80% of the total

samples, and thus phenotyped them as Le(a + b +). The confidence on this was based on the results of LE1 Le(a) mAb titration which clearly shows that using the 1:5000 dilution indicated by Nordgren et al. (2014), presented no cross-reactivity using the control saliva samples. As described in Fig. 2, the control samples identified here as 26,580 and 26,576 were easily phenotyped as Le(a + b-) and Le(a-b-) respectively, whereas samples 26,606, 26,574 and mainly 26,568 showed reactivity for both Le(a) and Le(b) mAb. Both absorbance values for positivity to Le(a) and Le(b) were well above the cutoff values: three and ten times the value of the calculated cutoff, respectively (data not shown). As to explain and/or verify the Le(a + b +) phenotyping, the coding and the 3' untranslated regions of the *FUT2* gene were amplified by PCR (Korbie and Mattick, 2008). The amplicons were sequenced to detect the known rs1047781 weak secretor genotype. The rs1047781 SNP was not detected in any of the samples, nor the principal SNP responsible for the non-secretor phenotype (rs601338) that has been observed in different populations (Kelly et al., 1995; Ferrer-Admetlla et al., 2009). Not all H-type 1 precursors are converted to H-type 1 antigens, depending on the efficacy of the *FUT2* enzyme, which may be regulated in several ways, including as of yet undescribed genetic polymorphisms, which can explain why both Lewis a and Lewis b can be present at the same time (De Mattos, 2016).

In different populations the non-secretor phenotype ranges from 10 to 20% (Ferrer-Admetlla et al., 2009). In the Brazilian population, the occurrence of this phenotype is also low (Vicentini et al., 2013; Bernardo et al., 2016), despite very few studies having been presented. The 8.2% of non-secretors found in children in the Amazon were thus consistent with previous results. The correlation between the SNPs detected in children from a Quilombola community of slave descendants, who live in Espírito Santo, Southeastern Brazil (Vicentini et al., 2013) with the SNPs detected in this study was low. Only the rs281377 was common between these two groups. Instead, younger children from the Amazon also have the rs1800027, rs375360260, rs602662, rs485073 and rs603985 in common with Asian populations including indigenous tribes phenotyped as Le(a + b +). These common SNPs were identified in Chinese and Thai populations (Chang et al., 1999; Yu et al., 1995), Taiwanese indigenous groups and Taiwanese populations (Yu et al., 1996, 1999, 2001), Native Chinese, Nepalese and Indonesian populations (Pang et al., 2001), and Taiwan aborigines (Chang et al.,

2002). We investigated the hypothesis that the population of indigenous ethnicity presents genetic HBGA markers related with the Asian population, by comparing the SNPs found in the *FUT2* gene from the saliva of these young children from the Amazon with SNPs already detected in the Asian population. One hundred and seventy-nine (50.85%) saliva samples were collected from the Boa Vista Municipality. This number is representative enough to consider some genetic proximity between native Asian and Amazonian individuals.

5. Conclusion

The population of young children in this study of the Amazonian region presented a phenotypic profile of the secretor and Lewis HBGA, and of *FUT2* gene SNPs, similar to those described in the Asian population, mainly of indigenous tribes. There was no difference to the profile found in children with AGE and ARI.

Funding

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq, Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro -FAPERJ and Oswaldo Cruz Institute- IOC (PAEF).

Conflict of interest

The authors are unaware of any conflict of interest.

Acknowledgements

The authors acknowledge all children and their parents for making this study possible. Thanks to Professor Dr. José Francisco Luitgardes Moura, coordinator of ObservARR for all his support throughout the Project and for his teachings on indigenous culture. To Bruno Baroni de Moraes e Souza for the English revision.

References

- Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.A., 2017. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Front. Microbiol.* 8, 2549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549>.
- Bernardo, C.R., Camargo, A.V.S., Ronchi, L.S., de Oliveira, A.P., Junior, E.C., Borim, A.A., de Mattos, C.C.B., Bestetti, R.B., de Mattos, L.C., 2016. ABO, secretor and Lewis histo-blood group systems influence the digestive form of Chagas disease. *Infect. Genet. Evol.* 45, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.027>.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503. <https://jcm.asm.org/content/jcm/28/3/495>.
- Bucardo, F., Kindberg, E., Paniagua, M., Grahn, A., Larson, G., Viklevall, M., Svensson, L., 2009. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J. Med. Virol.* 81, 728–735. <https://doi.org/10.1002/jmv.21426>.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A., 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Abridged Paperback ed. Princeton University Press, Princeton.
- Chang, J.G., Yang, T.Y., Liu, T.C., Lin, T.P., Hu, C.J., Kao, M.C., Wang, N.M., Tsai, F.J., Peng, C.T., Tsai, C.H., 1999. Molecular analysis of secretor type $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene mutations in the Chinese and Thai populations. *Transfusion* 39, 1013–1017. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39091013.x>.
- Chang, J.G., Ko, Y.C., Lee, J.C.I., Chang, S.J., Liu, T.C., Shih, M.C., Peng, C.T., 2002. Molecular analysis of mutations and polymorphisms of the Lewis secretor type $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene reveals that Taiwan aborigines are of Austronesian derivation. *J. Hum. Genet.* 47, 60–65. <https://doi.org/10.1007/s100380200001>.
- Cooling, L., 2015. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 801–870. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-14>.
- Cutbush, M., Gigglet, E.R., Moixson, P.L., 1956. Demonstration of the phenotype Le(a+b+) in infants and in adults. *Br. J. Haematol.* 2, 210–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1956.tb06829.x>.
- da Silva, M.F.M., Rose, T.L., Gomez, M.M., Carvalho-Costa, F.A., Fialho, A.M., de Assis, R.M.S., de Andrade, J.D.S.R., Volotão, E.M., Leite, J.P.G., 2015. 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. *Infect. Genet. Evol.* 30, 206–218. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.030>.
- Daniels, G., 2013. *Human Blood Groups*, third ed. Blackwell, London.
- De Mattos, L.C., 2016. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Rev. Bras. Hematol. e Hemoter.* 38, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.07.005>.
- Ferrer-Admetlla, A., Sikora, M., Laayouni, H., Esteve, A., Roubinet, F., Blancher, A., Calafell, F., Bertranpetit, J., Casals, F., 2009. A natural history of FUT 2 polymorphism in humans. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1993–2003. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp108>.
- Fung, M.K., Grossman, B.J., Hillyer, C.D., Westhoff, C.M., MT(ASCP)SBB, 2014. *Technical Manual. Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks*, eighteen ed. AABB (American Association of Blood Bank), USA.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., Lowe, J.B., 1995. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.* 270, 4640–4649. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4640>.
- Koda, Y., Soejima, M., Kimura, H., 2001. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg. Med. (Tokyo)* 3, 2–14. [https://doi.org/10.1016/S1344-6223\(01\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S1344-6223(01)00005-0).
- Korbie, D.J., Mattick, J.S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3, 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Monedero, V., Buesa, J., Rodríguez-Díaz, J., 2018. The interactions between host glyco-biology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. *Viruses* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3390/v10020096>.
- Munnink, B.B.O., van der Hoek, L., 2016. Viruses causing gastroenteritis: the known, the new and those beyond. *Viruses* 8, 42. <https://doi.org/10.3390/v8020042>.
- Nordgren, J., Sharma, S., Bucardo, F., Nasir, W., Günaydin, G., Ouermi, D., Nitiema, L.W., Becker-Dreps, S., Simpre, J., Hammarström, L., Larson, G., Svensson, L., 2014. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1567–1573. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu633>.
- Pang, H., Koda, Y., Soejima, M., Fujitani, N., Ogaki, T., Saito, A., Kawasaki, T., Kimura, H., 2001. Polymorphism of the human ABO-secretor locus (*FUT2*) in four populations in Asia: indication of distinct Asian subpopulations. *Ann. Hum. Genet.* 65, 429–437. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2001.6550429.x>.
- Ramani, S., Hu, L., Venkataram, P.B.V., Estes, M.K., 2016. Diversity in Rotavirus-host glycan interactions: a “sweet” spectrum. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2 (3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.03.002>.
- Ruiz-Linares, A., 2015. How genes have illuminated the history of early Americans and Latino Americans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008557>.
- Thorne, L., Nalwoga, A., Mentzer, A.J., Rougemont, A., Hosmillo, M., Webb, E., Nampijja, M., Muhwezi, A., Carstensen, T., Gurdasani, D., Hill, A.V., Sandhu, M.S., Elliott, A., Goodfellow, I., 2018. The first norovirus longitudinal seroepidemiological study from sub-Saharan Africa reveals high seroprevalence of diverse genotypes associated with host susceptibility factors. *J. Infect. Dis.* 218, 716–725. <https://doi.org/10.1093/infdis/ijy219>.
- Vicentini, F., Denadai, W., Gomes, Y.M., Rose, T.L., Ferreira, M.S.R., Le Moullac-Vaidy, B., Le Pendu, J., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Spano, L.C., 2013. Molecular characterization of Noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PLOS ONE* 8, e69348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069348>.
- WHO, 2017. *Diarrhoeal Disease. Fact Sheet*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Accessed date: 1 July 2018.
- Yu, L.C., Yang, Y.H., Broadberry, R.E., Chen, Y.H., Chan, Y.S., Lin, M., 1995. Correlation of a missense mutation in the human secretor $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak secretor allele (Se^w). *Biochem. J.* 312, 329–332. <https://doi.org/10.1042/bj3120329>.
- Yu, L.C., Broadberry, R.E., Yang, Y.H., Chen, Y.H., Lin, M., 1996. Heterogeneity of the human secretor (1,2) fucosyltransferase gene among Lewis (a+b+) non-secretors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 390–394. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0754>.
- Yu, L.C., Lee, H.L., Chu, C.C., Broadberry, R.E., Lin, M., 1999. A newly identified non-secretor allele of the human histo-blood group alpha(1,2)-fucosyltransferase gene (*FUT2*). *Vox Sang.* 76, 115–119. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1999.7620115.x>.
- Yu, L.C., Chu, C.C., Chan, Y.S., Chang, C.Y., Twu, Y.C., Lee, H.L., Lin, M., 2001. Polymorphism and distribution of the Secretor $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase gene in various Taiwanese populations. *Transfusion* 41, 1279–1283. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2001.41101279.x>.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14:725–30.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:12891-12896.

Almand EA, Moore MD, Jaykus LA. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Front Microbiol*. 2017; 8:2549.

Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*. 1975; i:1297.

Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, Hernandez Jd, de Oliveira CS, Oliveira Dde S, Araújo Eda C, Soares Lda S, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus Diversity in Diarrheic Children from an African-Descendant Settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56608.

Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*. 2018; 392:175-86.

Barreira DMPG, Fumian TM, Tonini MAL, Volpini LPB, Santos RP, Ribeiro ALC, Leite JPG, Moraes MTB, Brasil P, Cunha DC, Miagostovich MP, Spano LC.

Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in PLOS. One. 2016; 12 (12):e0189504.

Bezerra DA, Guerra SF, Serra AC, Fecury PC, Bandeira RS, Penha ET Jr, Lobo PS, Sousa EC Jr, Linhares AC, Soares LS, Mascarenhas JD. Analysis of a genotype G3P[9] rotavirus a strain that shows evidence of multiple reassortment events between animal and human rotaviruses. J Med Virol. 2017; 89:974-981.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 1973; 2:1281–3.

Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. N Engl J Med. 1991; 325: 252–64.

Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. Clin Microbiol Rev. 2014; 27(4):1048-74.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil Informe 2018. Fevereiro de 2019.

Brasil. Saúde Brasil 2017. Uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de

Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília DF, 2018.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Cobertura Vacinal 2010-2014. Brasília DF, 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo de monitoramento rápido de cobertura (MRC) em crianças menores de 5 anos de idade (6 meses e 4 a 11 meses e 29 dias) pós-campanha de multivacinação. Brasil, 2012. Brasília DF : 2012. 19 p.

Bucardo F, Nordgren J, Reyes Y, Gonzalez F, Sharma S, Sversson L. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Sci Rep.* 2017; 8:1502.

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. *Infect Genet Evol.* 2015; 34:106-13.

Campos GS, Silva Sampaio ML, Menezes AD, Tigre DM, Moura Costa LF, Chinalia FA, Sardi SI. Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol.* 2016; 88(1):166-70.

Cantelli CP, Velloso AJ, Assis RMS, Barros JJ, Mello FCDA, Cunha DCD, Brasil P, Nordgren J, Svensson L, Miagostovich MP, Leite JPG, Moraes MTB. Rotavirus A shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2018. *Sci Rep.* 2020; 24:10(1),6965.

Cantelli CP, Fumian TM, Malta FC, da Cunha DC, Brasil P, Nordgren J, Svensson L, Miagostovich MP, Moraes MTB, Leite JPG. Norovirus infection and genetic susceptibility of the HBGA host in a birth community cohort, Rio de Janeiro, Brazil. *Infeção, genética e evolução* (2020)

Carvalho-Costa FA, Assis RMS, Fialho AM, Araújo IT, Silva MF, Gómez MM, et al. A epidemiologia em evolução da infecção por rotavírus A no Brasil uma década após o introdução da vacinação universal com Rotarix1. *BMC Pediatr* 2019; 19: 42.

Castelo-Branco FLC, Pereira TM, Delfino BM. Desigualdades socioeconômicas ainda são uma barreira para a cobertura total da vacina infantil na Amazônia brasileira: um estudo transversal em Assis Brasil, Acre, Brasil . *Int J Equity Health*. 2014; 13:118

Castro LRP, Calvet FC, Sousa KL, Silva VP, Lobo PS, Penha ET Junior, Guerra SFS, Bezerra DAM, Mascarenhas JDP, Pinheiro HHC, Costa IB, Resque HR, Soares LS. Prevalence of rotavirus and human bocavirus in immunosuppressed individuals after renal transplantation in the Northern Region of Brazil. *J Med Virol*. 2019; 91(12):2125-2133.

Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999a; 48(2):1-20.

Centers for Disease Control and Prevention. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999b; 48(43):1007.

Charles T, Penninga L, Reurings JC, Berry MC. Intussusception in children: A clinical review. *Acta Chir Belg.* 2015; 115:327-33.

Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.* 2019; Sep 4.

Cilli A, Luchs A, Leal E, Gill D, Milagres FAP, Komninakis SV, Brustulin R, Teles MDAR, Lobato MCABS, Chagas RTD, Abrão MFNDS, Soares CVDA, Deng X, Delwart E, Sabino EC, Costa ACD. Human sapovirus GI.2 and GI.3 from children with acute gastroenteritis in northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 4:114e180574.

Colston JM, Francois R, Pisanic N, Yori PP, McCormick BJJ, Olortegui MP, Svensen E, Mduma MMAE, Liu J, Houpt ER, Klapheke R, Schwarz JW, Atmar RL, Black RE, Kosek MN. Effects of child and maternal Histo Blood Group Antigen status on symptomatic and asymptomatic enteric infections in early childhood. *J Infect Dis.* 2019; 5,220(1):151-162.

Cooling L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28:801–70.

Costa I, Linhares AC, Cunha MH, Tuboi S, Argüello DF, Justino MC, Gopala K, Ortega-Barria E, Colindres R. Sustained Decrease in Gastroenteritis-related Deaths and Hospitalizations in Children Less Than 5 Years of Age After the Introduction of Rotavirus Vaccination: A Time-Trend Analysis in Brazil (2001-2010). *Pediatr Infect Dis J.* 2016; 180-90.

Costa LCPDN, Siqueira JAM, Portal TM, Sousa EC Júnior, Linhares ADC, Gabbay YB, Resque HR. Detection and genotyping of human adenovirus and sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: first detection of GI.7 and GV.2 sapoviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(5):621-628.

Costa STPD, Fumian TM, Lima ICG, Siqueira JAM, Silva LDD, Hernández JDM, Lucena MSS, Reymão TKA, Soares LDS, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(6):391-395.

Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O’Ryan, Kang G, Desselberger U, Estes MK. Rotavirus infection *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 3:17083.

Cutubush M, Giglett ER, Moixison PL. Demonstration of the phenotype Le(a+b+) in infants and in adults. *Br J Haematol.* 1956; 2:210-20.

Daniels G. *Human Blood Groups*, third ed Blackwell, London. 2013.

das Neves Costa LCP, Teixeira DM, Portela ACR, de Lima ICG, da Silva Bandeira R, Sousa Júnior EC, Siqueira JAM, Resque HR, da Silva LD, Gabbay YB. Molecular and evolutionary characterization of norovirus GII.17 in the northern region of Braz *BMC Infect Dis.* 2019; 2,19(1):1021.

de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*. 2016; 14:421–33.

de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, Templeton K, Mans J, Nordgren J, Reuter G, Lynch M, Rasmussen LD, Iritani N, Chan MC, Martella V, Ambert-Balay K, Vinjé J, White PA, Koopmans MP. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 2015; 20(26):pii: 21178.

de Oliveira LH, Camacho LA, Coutinho ES, Ruiz-Matus C, Leite JP. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2015; 33 Suppl 1: A248-54.

Desselberger U. Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses*. 2019. *Viruses*. 2019 Mar; 11(3):286.

do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, Lopman B, Flannery B, de Oliveira LH, Carmo EH, Patel M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med* 2011; 8:e1001024.

Donato C, Vijaykrishna D. The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian Astroviruses. *Viruses*. 2017; 9:102.

Ferrer-Admetlla A, Sikora M, Laayouni H, Esteve A, Roubinet F, Blancher A, Calafell F, Bertranpetit J, Casals FA natural history of FUT 2 polymorphism in humans. *Mol Biol Evol*. 2009; 26:1993–2003.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. V.2,p.1497,1973.

Gaythorpe KAM, Trotter CL, Lopman B, Steele M, Conlan AJK. Norovirus. *Epidemiol Infect*. 2018;146(2):147-158.

GBD: Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the global burden of disease study. 2016.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(18):1776–85.

Gomes SA, Gabbay YB, Nascimento JP, Niel C. Genome analysis of adenovirus 4a, a causative agent of pharyngoconjunctival fever and respiratory diseases in Brazil. *J Med Virol*. 1988; 26(4):453-9.

Gomes KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol*. 2004; 79(11): 1703-1709.

Gómez MM, Resque HR, Volotão Ede M, Rose TL, da Silva MF, Heylen E, Zeller M, Matthijnssens J, Leite JP. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2014; 28:385-8.

Guerra SF, Linhares AC, Mascarenhas JD, Oliveira A, Justino MC, Soares LS, Müller EC, Brasil P, Tuboi S, Ortega-Barria E, Colindres R. Rotavirus strain surveillance for three years following the introduction of rotavirus vaccine into Belém, Brazil. *J Med Virol.* 2015; 1303-10.

Guerra SF, Soares LS, Lobo PS, Penha Júnior ET, Sousa Júnior EC, Bezerra DA, Vaz LR, Linhares AC, Mascarenhas JD. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. *J Gen Virol.* 2016; 97:3131-3138.

Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol.* 2016; 21,22(39):8684-8697.

Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SFC, Oliveira, DMP, Fontes, PB, Barros, VF, Ramos, MF, Dove, W. Nakagomi T. Nakagomi, O., Correia, JB, Cunliffe, Cuevas LE. Incidence of rotavirus and all cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology.* 2009. 137:1970–1975.

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SFC, Barros, VCF, Fontes, PB, Salustino, EF, Nakagomi, O, Nakagomi T, Dove W, Cunliffe N, Hart C. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1571–1573.

Gutierrez, Meylin & Fialho, Alexandre & Maranhão, Adriana & Malta, Fábio & Andrade, Juliana & Assis, Rosane & Mouta, Sérgio & Miagostovich, Marize & Leite, José & Fumian, Tulio. (2020). Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018–2019. *Pathogens.* 9. 515. 10.3390/pathogens9070515.

Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Krenzel U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Curr Opin Struct Biol.* 2017; 44:190-200.

Hernandez JDM, Silva LDD, Sousa EC Junior, Lucena MSS, Soares LDS, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. 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; 39:365-371.

Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Este MK, Prasad BV. Cell attachment protein vp8* of a human rotavirus specifically interacts with a-type histo-blood group antigen. *Nature.* 2012; 485:256–259.

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.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010, sobre a distribuição da população indígena no território nacional. Brasília. 2010.

Ichihara MY, Rodrigues LC, Teles Santos CA, Teixeira Mda G, De Jesus SR, Alvim De Matos SM, Gagliardi Leite JP, Barreto ML. Effectiveness of rotavirus vaccine against hospitalized rotavirus diarrhea: A case-control study. *Vaccine* 2014; 32:2740-7.

Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(4).

Jiang X, Liu Y, Tan M. Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus, new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy. *Emerg Microbes & Infect.* 2017; 6:e22.

Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet.* 1997; 350(9086):1205-9.

Justino MC, Brasil P, Abreu E, Miranda Y, Mascarenhas JD, Guerra SF, Linhares AC. Clinical Severity and Rotavirus Vaccination among Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis in Belém, Northern Brazil. *J Trop Pediatr.* 2016; 62:276-81.

Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Perez-Schael I, Clemens SAC, Innis B, Yarzabal JP, Cervantes Y, Hardt K, De Vos B. 2006. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine.* 2006; 24(18):3784-5.

Kajon AE, Portes SA, de Mello WA, Nascimento JP, Siqueira MM. Genome type analysis of Brazilian adenovirus strains of serotypes 1,2,3,5, and 7 collected between 1976 and 1995. *J Med Virol.* 1999; 58(4):408-12.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; 10:1075–81.

Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 2:S295-302.

Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group a (1, 2)-fucosyltransferase gene (FUT2): homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem.* 1995; 270:4640-49.

Lee B, Dickson DM, deCamp AC, Ross Colgate E, Diehl SA, Uddin MI, Sharmin S, Islam S, Bhuiyan TR, Alam M, Nayak U, Mychaleckyj JC, Taniuchi M, Petri WA Jr, Haque, R, Qadri, F, Kirkpatrick BD. Histo-blood group antigen phenotype determines susceptibility to genotype-specific rotavirus infections and impact measures of rotavirus vaccine efficacy. *J Infect Dis* 2018; 217:1399-1407.

Leitão GAA, Olivares AIO, Pimenta YC, Delgado IF, Miagostovich MP, Leite JPG, Moraes MTB. Human bocavirus 1 and 2 genotypes detected in younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections respectively. *Int J Infect Dis.* 2020; 95:32-37.

Leite JPG, Barth OM, Schatzmayr HG. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86(4); 489-490.

Leppard KN. Adenoviruses: Molecular Biology. *Encyclopedia of Virology.* 2008; 17-23.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, de Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TA, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Valente SA. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull World Health Organ.* 1996;74(5):491-500.

Linhares AC, Justino MC. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13:43-57.

Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am J Epidemiol*. 1981; 113:703-10.

Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodriguez JA, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2011; 21:89-109.

Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. 1975; *Lancet* 6:451–452.

Malik YS, Verma AK, Kumar N, Touil N, Karthik K, Tiwari R, Bora DP, Dhama K, Ghosh S, Hemida MG, Abdel-Moneim AS, Bányai K, Vlasova AN, Kobayashi N, Singh RK. Advances in Diagnostic Approaches for Viral Etiologies of Diarrhea: From the Lab to the Field. *Front Microbiol*. 2019; 13,10:1957.

Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clement M, Le Pendu J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 2001; 83:565-73.

Martin C.W. Chan, Yunwen Hu, Haili Chen, Alexander T. Podkolzin, Ekaterina V. Zaytseva, Jun Komano, Naomi Sakon, Yong Poovorawan, Sompong

Vongpunsawad, Thanundorn Thanusuwannasak, Joanne Hewitt, Dawn Croucher, Nikail Collins, Jan Vinjé, Xiaoli L. Pang, Bonita E. Lee, Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Marion P.G. Koopmans, Sandra Niendorf, Mateja Poljsak-Prijatelj, Andrej Steyer, Peter A. White, Jennifer H. Lun, Janet Mans, Tin-Nok Hung, Kirsty Kwok, Kelton Cheung, Nelson Lee, and Paul K.S. Chan. Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016. *Emerg Infect Dis.* 2017; 8:1359–4.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 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. *J Virol.* 2018; 82:3204-19.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011; 156:1397-413.

Méndez, E.; Arias, C. Astroviruses. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D., Howley, P., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013.

Mokomane M, Kasvosve I, de Melo E, Pernica JM, Goldfarb DM. The global problem of childhood diarrhoeal diseases: emerging strategies in prevention and management. *Ther Adv Infectious Dis.* 2018; 5:29-30.

Monedero V, Buesa J, Rodríguez-Díaz J. The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. *Viruses* 2018; 10:1-14.

Moraes MTB, Olivares AIO, Fialho AM, Malta FC, Mouta Junior SS, Bispo RS, Velloso AJ, Leitão, GAA, Cantelli CP, Nordgren J, Sverson L, Miagostovich MP, Leite JPG. 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; 70:61-6.

Murphy BR, Morens DM, Simonsen L, Chanock RM, La Montagne JR, Kapikian AZ. Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions. *J Infect Dis.* 2003; 187(8):1301-8.

Nemerow G, Flint J. Lessons learned from adenovirus (1970-2019). *FEBS Lett.* 2019; 593(24):3395-3418.

Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses.* 2019; 11:226.

O'Brien S, Sanderson R, Rushton. Control of norovirus infection. *Gastroenterology.* 2019; 35:14-1.

Olivares AIO, Leitão GAA, Pimenta YC, Cantelli CP, Fumian TM, Fialho AM, Mouta Junior SS, Delgado IF, Nordgren J, Svensson L, Miagostovich MP, Moraes MTB, Leite JPG. Gastroenteritis and acute respiratory infections in children from Amazonian region: rotavirus A, norovirus, adenovirus, sapovirus

detection and host histo blood group antigen susceptibility. Submetido à revista: Journal of Medical Virology. 2020a;

Olivares AIO, Moraes MTB, De Queiroz HCF, Pimenta YC, Leitão GAA, Cantelli CP, Miagostosvich MP, Leite JPG. First report of novel human astrovirus MLB2 in Brazil detected in children with acute gastroenteritis living in Boa Vista, state of Roraima. Submetido à revista: Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2020b;

Oliveira DMM, Souza M, Fiaccadori FS, Santos HCP, Cardoso DDP. Monitoring of Calicivirus among day-care children: Evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 norovirus and GI.3 sapovirus in Brazil. J Med Virol. 2014; 86:1569–157.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. N Engl J Med. 1977; 297:86-89.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. Journal of Clinical Virology 2009; 44(1): 1–8.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. Bull Pan Am Health Organ. 1993; 27(3):224-33.

Pérez-Schael I, Guntiñas MJ, Pérez M, Pagone V, Rojas AM, González R, Cunto W, Hoshino Y, Kapikian AZ. Efficacy of the rhesus rotavirus-based

quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med.* 1997; 337(17):1181-7.

Pogan R, Ilfer JD, Utrecht C. Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology.* 2018; 31:59-65.

Poló TS, Peiró JR, Mendes LCN, Ludwig LF, de Oliveira-Filho E, Bucardo F, Hynen P, Melin P, Thiry E, Mauroy A. Human norovirus infection in Latin America. *J Clin Virol.* 2016; 78:111-119.

Portal TM, Reymão TKA, Quinderé Neto GA, Fiuza MKDC, Teixeira DM, Lima ICG, Sousa Júnior EC, Bandeira RDS, De Deus DR, Justino MCA, Linhares ADC, Silva LDD, Resque HR, Gabbay YB. Detection and genotyping of enteric viruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil: Occurrence of adenovirus viremia by species F, types 40/41. *J Med Virol.* 2019; 91(3):378-384.

Portal TM, Siqueira JAM, Costa LCPN, de Lima ICG, Lucena MSS, Bandeira, RS, Linhares AC, da Luz CRNE, Gabbay YB, Resque HR. Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997–1999: detection of norovirus GII.12. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(3):724-730.

Portes SAR, Carvalho-Costa FA, Rocha MS, Fumian TM, Maranhão AG, de Assis RM, Xavier MDPTP, Rocha MS, Miagostovich MP, Leite JPG, Volotão EM. Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *PLoS One.* 2017; 30:12(8):e0183196.

Portes SA, Volotão Ede M, Rocha MS, Rebelo MC, Xavier Mda P, Assis RM, Rose TL, Miagostovich MP, Leite JP, Carvalho-Costa FA. A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 24;111(6):403-6.

Prado T, Miagostovich MP. Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review. *Cad Saude Publica*. 2014; 30(7):1367-78.

Primo D, Pacheco GT, Timenetsky MDCST, Luchs A. Surveillance and molecular characterization of human adenovirus in patients with acute gastroenteritis in the era of rotavirus vaccine, Brazil, 2012-2017. *J Clin Virol*. 2018;109:35-40.

Ramani S, Hu L, Venkataram PBV, Estes MK. Diversity in Rotavirus-host glycan interactions: a “sweet”. spectrum. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016; 2:263–73.

Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TA, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(8): 969-74.

Reymão TK, Hernandez JD, Costa ST, Sousa MS, Oliveira DS, Silva LD, Bandeira RD, Lima IC, Soares LD, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Sapovirus in children with acute gastroenteritis from Manaus, Amazon region, Brazil, 2010-2011. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016; 3: 58:81.

Roback, JD, Combs MR, Grossman B, Hillyer C. Technical Manual. Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks, USA. 2006.

Robinson CM, Singh G, Lee JY, Dehghan S, Rajaiya J, Liu EB, Yousuf MA, Betensky RA, Jones MS, Dyer DW, Seto D, Chodosh J. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep.* 2013; 3:1812.

Rocha HA, Silva AC, Correia LL, Campos JS, Machado MM, Leite ÁJ, da Cunha AJ. Effects of Vitamin A supplementation on child morbidity: a twenty-year time series analysis in the northeastern region of Brazil. *Matern Child Health J.* 2015; 19:1652-6.

Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006; 354:11-22.

Santos FS, Sousa Junior EC, Guerra SFS, Lobo PS, Penha Junior ET, Lima ABF, Vinente CBG, Chagas EHN, Justino MCA, Linhares AC, Matthijnssens J, Soares LS, Mascarenhas JDP. G1P[8] Rotavirus in children with severe diarrhea in the post-vaccine introduction era in Brazil: Evidence of reassortments and structural modifications of the antigenic VP7 and VP4 regions. *Infect Genet Evol.* 2019; 69:255-266.

Santos VS, Nóbrega FA, Soares MWS, Moreira RD, Cuevas LE, Gurgel RQ. Rotavirus Genotypes Circulating in Brazil Before and After the National Rotavirus Vaccine Program. 2017; 37(3):63-65.

Schlenker C, Surawicz C. Emerging infections of the gastrointestinal tract. Best practice & research Clinical gastroenterology, v. 23, n. 1, p. 89-99, 2009.

Secretaria de Saúde do Estado de Roraima (SESAU-RR), Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Relatório anual de epidemiologia de Roraima 2017. 2018, publicação on line.

Sharma S, Hagbom M, Svensson L, Nordgren J. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take. Viruses. 2020; 17,12(3):pii: E324.

Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(8):1069-73.

Silva LD, Bandeira RD, Junior EC, Lima IC, da Penha Júnior ET, Teixeira DM, Siqueira JA, Resque HR, de Abreu Campos EM, Justino MC, Linhares AC, Gabbay YB. 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.

Silva LD, Rodrigues EL, Lucena MS, Lima IC, Oliveira D de S, Soares LS, Mascarenhas JD, Linhares Ada C, Gabbay YB. Detection of the pandemic

norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2013; 108(8):1068-1070.

Siqueira JA, Linhares Ada C, de Carvalho TC, Aragão GC, Oliveira Dde S, Dos Santos MC, de Sousa MS, Justino MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. *J Med Virol*. 2013a; 85(4):737-44.

Siqueira JA, Linhares Ada C, Gonçalves M dos S, Carvalho TC, Justino MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013b.108(5): 661-664.

Siqueira JAM, Oliveira DS, De Carvalho TCN, Portal TM, Justino MCA, Silva LD, Resque HR, Gabbay YB. Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features. *J Clin Virol*. 2017a; 94:79-85.

Siqueira JAM, Bandeira RDS, Oliveira DS, Dos Santos LFP, Gabbay YB. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. *PLoS One*. 2017b; 12(6).

Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, Lu X, Erdman DD. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virol*. 2010; 48(2):127-30.

Soares LS, Guerra SFS, Oliveira ASL, dos Santos FS, Menezes EMFC, Mascarenhas JD, Linhares AC. Diversity of Rotavirus Strains Circulating in

Northern Brazil After Introduction of a Rotavirus Vaccine: High Prevalence of G3P [6] Genotype. *J Med Virol.* 2014; 86:1065–72.

Soares LS, Lima ABF, Pantoja KC, Lobo PS, Cruz JF, Guerra SFS, Bezerra DAM, Bandeira RS, Mascarenhas JDP. Molecular epidemiology of human bocavirus in children with acute gastroenteritis from North Region of Brazil. *J Med Microbiol.* 2019; 68(8):1233-1239.

Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP). Departamento Científico de Gastroenterologia. Guia Prático de Atualização. Diarreia aguda: diagnóstico e tratamento Nº 1, Março de 2017.

Soejima M, Koda Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med* 2005; 7:266-9.

Soejima M, Pang H. & Koda, Y. Genetic variation of FUT2 in a population of Ghana: identification of four new mutations and inference of equilibrium selection. *Ann Hematol* 86, 199–204 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00277-006-0203-4>

Stewien KE, da Cunha LC, Alvim Ade C, dos Reis Filho SA, Alvim MA, Brandão AA, Neiva MN. Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luís (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33:459-64.

Teixeira DM, Hernandez JM, Silva LD, Oliveira Dde S, Spada PK, Gurjão TC, Mascarenhas JD, Linhares AC, Morais LL, Gabbay YB. Occurrence of

Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol.* 2016; 8(1):101-4.

Teixeira DM, Spada PK, Morais LL, Fumian TM, Lima IC, Oliveira DS, Bandeira RD, Gurjão TC, Sousa MS, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belém city, Northern Brazil. *J Water Health.* 2017; 15(1):163-174.

The MAL-ED Network Investigators. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *The Lancet Global Health.* 2018; 6(12):e1309–e1318.

Tonon KM, de Morais MB, Abrão ACFV, Miranda A, Morais TB. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. *Nutrients.* 2019;11(6).

van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, He-witt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, White PA, Koopmans M. Noro Net indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 2013; 18: 8-9.

Vesikari T, Isolauri E, D'hondt E, Delem A, André FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet*, v.1, p. 977-81, 1984.

Vesikari T, Clark HF, Offit PA, Dallas MJ, Di Stefano DJ, Goveia MG, Ward RL, Schödel F, Karvonen A, Drummond JE, Di Nubile MJ, Heaton PM. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine* 2006; 24: 4821-9.

Vieira CB, Corre AA, de Jesus MS, Luz SLB, Wyn-Jones P, Kay D, Rocha MS, Miagostovich MP. The Impact of the Extreme Amazonian Flood Season on the Incidence of Viral Gastroenteritis Cases. *Food. Environ. Virol.* 2017; 9:195–207.

Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM, Strina A, Barreto ML, Miagostovich MP, Leite JPG. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*; 2009: 42(5): 438-44.

Xavier MPTP, Carvalho Costa FA, Rocha MS, Andrade Jda S, Diniz FK, Andrade TR, Miagostovich MP, Leite JP, Volotão Ede M. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PLoS One*. 2015; 14;10(8):e0135687.

World Health Organization (WHO). Top 10 causes of death. 2016. [cited 28 Jul. 2020]. Available from https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.

Wunderli W, Meerbach A, Guengoer T, Berger C, Greiner O, Caduff R, Trkola A, Bossart W, Gerlach D, Schibler M, Cordey S, McKee TA, Van Belle S, Kaiser L, Tapparel C. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS ONE*. 2011; e27483.