

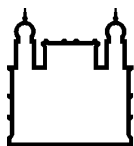
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS EM UMA COORTE
PROSPECTIVA DE RECÉM-NASCIDOS E LACTENTES DA
COMUNIDADE DE MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO, E SUAS
CORRELAÇÕES COM A VACINA MONOVALENTE ROTARIX®

DENISE COTRIM DA CUNHA

Rio de Janeiro
Janeiro de 2023



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DENISE COTRIM DA CUNHA

Infecções por rotavírus em uma coorte prospectiva de recém-nascidos e lactentes da comunidade de Manguinhos, Rio de Janeiro, e suas correlações com a vacina monovalente Rotarix®

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical

Orientadores: Prof. Dr^a. Patricia Brasil
Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2023

ii

Cotrim da Cunha, Denise.

Infecções por rotavírus em uma coorte prospectiva de recém-nascidos e lactentes da comunidade de Manguinhos, Rio de Janeiro, e suas correlações com a vacina monovalente Rotarix® / Denise Cotrim da Cunha. - Rio de Janeiro, 2023.

xvi, 107 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2023.

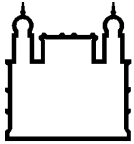
Orientadora: Patricia Brasil.

Co-orientador: Filipe Anibal Carvalho-Costa.

Bibliografia: f. 55-72

1. rotavírus. 2. transmissão comunitária. 3. vacinação. 4. coorte infantil.
5. saúde pública. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: DENISE COTRIM DA CUNHA

INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS EM UMA COORTE PROSPECTIVA DE RECÉM-NASCIDOS E LACTENTES DA COMUNIDADE DE MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO, E SUAS CORRELAÇÕES COM A VACINA MONOVALENTE ROTARIX®

**ORIENTADORES: Prof. Dr^a. Patricia Brasil
Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa**

Aprovada em: 17/01/2023

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Martha Suárez-Mutis – Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof^a. Dr^a. Maria Cleonice Aguiar Justino (Instituto Evandro Chagas)
Prof^a. Dr^a. Susie Andries Nogueira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Prof^a. Dr^a. Thalita Fernandes de Abreu (Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Horta (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 17 de janeiro de 2023

Dedico este trabalho aos participantes da pesquisa e seus familiares. Foi uma experiência gratificante e um enorme aprendizado ter acompanhado os bebês desde seus primeiros dias de vida, vê-los crescendo e se desenvolvendo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Patricia Brasil, pelo encorajamento e apoio nos momentos mais críticos, pelo entusiasmo demonstrado pelo meu trabalho e pela orientação valiosa. Muito obrigada.

Ao meu coorientador, Filipe Aníbal Carvalho-Costa, pela concepção inicial do projeto e do artigo, pelas explicações e discussões que enriqueceram e nortearam o trabalho.

A Trevon Fueller pelo auxílio fundamental na análise estatística, mas principalmente pela inestimável e incansável colaboração na revisão do artigo, nas respostas aos revisores e na correção do inglês.

À toda equipe do ambulatório e do Laboratório de Doenças Febris Agudas: pediatras, enfermeiras, técnicas de enfermagem, coletoras, agentes de campo, motoristas, coordenadoras e administrativos, que tornaram possível a execução do projeto. Em especial, Lidia Feitoza do Nascimento Maia e Patricia do Nascimento Ferreira Monteiro, que foram fundamentais na recuperação dos participantes considerados “perdidos”, na atualização dos dados e na digitação de todos os formulários.

Ao Laboratório de Referência em Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz pela execução dos testes diagnósticos nas amostras de fezes.

Às chefias, profissionais de saúde e equipe administrativa do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria e Clínica da Família Victor Valla, pelo acolhimento da nossa equipe e pela presteza em ceder os espaços para o atendimento dos participantes.

Aos meus queridos colegas de trabalho da Fiocruz e do Hospital Federal dos Servidores do Estado pelo apoio e compreensão durante o período das disciplinas, especialmente durante a pandemia nas aulas *on-line*, e na fase final do doutorado.

A Rodrigo Amâncio pela revisão e pelos comentários espirituosos.

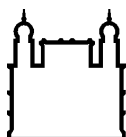
À Maya, recém-alfabetizada e tão esperta, pela ajuda para digitar as fichas no início do projeto.

Aos meus pais e minha irmã, exemplos de correção e dedicação ao trabalho, em especial ao serviço público, e que sempre me estimularam a estudar.

Ao meu querido Mario, *my fellow my guy*, marido e companheiro de uma vida.

“O amor constrói. Gostarmos de alguém, mesmo quando estamos parados durante o tempo de dormir, é como fazer prédios ou cozinhar para mesas de mil lugares. Mas amar é um trabalho bom. A minha mãe diz.”

Valter Hugo Mãe em O paraíso são os outros



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS EM UMA COORTE PROSPECTIVA DE RECÉM-NASCIDOS E LACTENTES DA COMUNIDADE DE MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO, E SUAS CORRELAÇÕES COM A VACINA MONOVALENTE ROTARIX®

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Denise Cotrim da Cunha

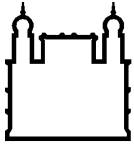
A expansão global da imunização com a vacina oral contra o rotavírus humano (RV1) reduziu a carga de doença diarreica aguda (DDA) e a mortalidade associada, através da ação direta em imunizados e pela imunidade de rebanho conferida pela circulação do vírus vacinal excretado nas fezes. Embora a transmissão comunitária do vírus vacinal tenha sido comprovada em crianças e contatos domiciliares, a excreção fecal por recém-nascidos e lactentes menores de seis semanas de idade ainda não havia sido demonstrada.

O estudo de coorte foi realizado em Manguinhos, comunidade vulnerável da zona norte do município do Rio de Janeiro, com o objetivo de identificar a circulação do genótipo vacinal G1P[8] nas fezes. Os participantes foram acompanhados desde os primeiros dias de vida até dois anos de idade, para detecção do genótipo vacinal antes e após a imunização, e para monitorá-los quanto à presença de DDA.

As fezes foram coletadas de recém-nascidos e lactentes quinzenalmente até 45 dias de vida, após ambas as doses de RV1 e em episódios de DDA diagnosticados até os 24 meses de idade. Foi utilizada qRT-PCR para detecção do rotavírus e RT-PCR multiplex e/ou pelo método de sequenciamento de nucleotídeos de Sanger para genotipagem (G/P).

Os 242 participantes foram acompanhados, em média entre dezembro de 2014 e setembro de 2019. Foram coletadas 890 amostras fecais, triadas com os métodos moleculares citados. A prevalência de G1P[8] vacinal foi de 3,3% em recém-nascidos e lactentes com menos de seis semanas de idade, 50% após a primeira dose e 25,5% após a segunda dose da vacina. Dos 70 participantes que apresentaram DDA durante o período, o rotavírus foi detectado em seis deles, e o genótipo vacinal em apenas um (prevalência de 1,4%). A maioria dos lactentes com DDA era vacinada contra rotavírus e foi tratada ambulatorialmente. Não foram observados eventos adversos pós-vacinais graves após as duas doses de Rotarix®.

Este estudo fornece a primeira evidência de mundo real em relação à excreção do genótipo vacinal G1P[8] por recém-nascidos e lactentes com menos de seis semanas de idade em uma comunidade com recursos socioeconômicos limitados. É importante ressaltar que esta população permaneceu assintomática.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rotavirus infections in a prospective cohort of neonates and infants from the community of Manguinhos, Rio de Janeiro, and their correlations with the monovalent vaccine Rotarix®

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Denise Cotrim da Cunha

The expansion of immunization with the monovalent vaccine against human rotavirus (RV1) in several countries around the world has reduced the burden of acute diarrheal disease (ADD) and associated mortality, through direct action on immunized subjects and by herd immunity as a result of the circulation of the vaccine virus excreted in feces. Although community transmission of live attenuated monovalent rotavirus vaccine virus has been demonstrated in children and household contacts, fecal shedding of these strains in neonates and infants under six weeks of age has never been demonstrated.

This was a prospective cohort study carried out in Manguinhos, a low-resource community situated in the north region of Rio de Janeiro, with the aim of analyzing the circulation of vaccine derived virus G1P[8] detected in stool samples. Participants were followed from the first days of life until 24 months of age, for detection of the vaccine-derived virus before and after immunization and to monitor them for the presence of ADD.

Samples were collected from neonates and children every two weeks through 45 days of life, after both doses of RV1, and in ADD episodes up to two years of age. Rotavirus shedding was screened by RT-qPCR and G/P genotypes determined by multiplex RT-PCR and/or Sanger nucleotide sequencing.

We enrolled 242 participants who were followed from December 2014 to September 2019. During the period, 890 stool samples were collected and screened with the aforementioned molecular methods. The prevalence of RV1 virus was 3,3% in neonates and infants less than six weeks of age, 50% after the first dose, and 25,6% after the second dose of the vaccine. Among the 70 participants who had ADD during the study, rotavirus was detected in seven samples, with RV1 virus being confirmed in only one participant (1.4% prevalence). Most infants with ADD were fully immunized against rotavirus and all were treated on an outpatient basis. No serious post-vaccination adverse events were observed after the two doses of Rotarix®.

This study provides the first real-world evidence of RV1 virus shedding by neonates and infants under six weeks of age in a resource-limited community. Importantly, this population remained asymptomatic.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.1 <i>Estrutura do vírus, classificação e diversidade dos genótipos</i>	5
1.1.2 <i>Vias de exposição e transmissão</i>	8
1.1.3 <i>Patogênese</i>	9
1.1.4 <i>Resposta imunológica</i>	9
1.1.5 <i>Manifestações clínicas</i>	10
1.1.6 <i>Achados laboratoriais</i>	14
1.1.7 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	14
1.1.8 <i>Tratamento</i>	15
1.1.9 <i>Imunização</i>	16
1.1.10 <i>Cobertura vacinal</i>	21
1.2 Justificativa.....	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Contextualização do local de estudo e ações de saúde no território.....	25
3.2 Serviços de saúde no Complexo de Manguinhos: Teias-Escola Manguinhos.....	28
3.3 Período do estudo.....	30
3.4 Critério de elegibilidade para participação no estudo	30
3.5 Critérios de inclusão	30

3.6	Critérios de exclusão	31
3.7	Seguimento	31
3.8	Tamanho da amostra.....	33
3.9	Análise estatística	34
3.10	Coleta, transporte e conservação de amostras fecais	34
3.11	Ensaio laboratoriais	35
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	53
7	PERSPECTIVAS	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9	ANEXOS E APÊNDICES	73
	Anexo 1 - Parecer do CEP	73
	Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido	76
	Apêndice 2 - Formulário dados do nascimento e imunizações	79
	Apêndice 3 - Formulário dados sociodemográficos.....	80
	Apêndice 4 - Formulário individual de atendimento	81
	Apêndice 5 - Artigos publicados	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxas de mortalidade (por 100.000) por rotavírus em crianças menores de 5 anos, por país, em 2017.....	2
Figura 2. Mapa de introdução da vacina contra rotavírus.....	3
Figura 3. Cobertura vacinal anual da vacina contra rotavírus no mundo.....	5
Figura 4. Estrutura e localização dos componentes proteicos do vírion do rotavírus.....	6
Figura 5. Distribuição dos genótipos de RV-A no Brasil antes e após introdução da vacinação com Rotarix® em 22 estados brasileiros. Dados do monitoramento realizado pelo Laboratório de Referência Regional em Rotavirose (LRRR)/Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).....	20
Figura 6. Coberturas vacinais da vacina contra rotavírus no Brasil, 2006-2022.....	21
Figura 7. Vista aérea do território de Manguinhos com suas sublocalidades.....	29
Figura 8. Vista aérea da Fundação Oswaldo Cruz, Campus Manguinhos.....	30
Figura 9. Fluxograma para recrutamento e acompanhamento dos participantes.....	38
Figura 10. Probabilidade de eliminação de G1P[8] vacinal em dias após D1 (A) e após D2 (B) da Rotarix®.....	40
Figura 11. Eliminação fecal de G1P[8] vacinal nos diferentes momentos da coorte....	43
Figura 12. Mapa da área de estudo e distribuição espacial dos domicílios frente à circulação de vírus vacinal.....	44

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Calendário de visitas do estudo.....	32
Tabela 1. Dados sociodemográficos dos participantes.....	39
Tabela 2. Taxas de positividade de RV-A e genótipos identificados.....	41
Tabela 3. Dados dos participantes com DDA causada por RV-A.....	45
Tabela 4. Resultados das análises das amostras de fezes de DDA dos grupos com e sem excreção de RV-A após a vacinação.....	46
Tabela 5. Eventos supostamente atribuíveis à vacinação contra rotavírus.....	46
Tabela 6. Eventos supostamente atribuíveis à vacinação em participantes que excretaram RV-A após D1 e D2.....	47

Lista de Siglas e Abreviaturas

CFVV – Clínica da Família Victor Valla

COVID-19 – *corona virus disease*

CRIE – Centro de referência de imunobiológicos especiais

CSEGSF - Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria

DDA - Doenças diarreicas agudas

DFA – Laboratório de doenças febris agudas

DSS – Determinantes sociais da saúde

DTP - vacina tríplice bacteriana difteria/tétano/pertussis

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ENSP - Escola Nacional de Saúde Pública

ESF - Estratégia de Saúde da Família

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

GBD – *Global Burden of Diseases*

HBGA – antígenos de histogrupos sanguíneos

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH - Índice de desenvolvimento humano

IDS - Índice de desenvolvimento social

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

INI – Instituto Nacional de Infectologia

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

LVCA - Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

NSP - Proteína viral não-estrutural

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-americana da Saúde

PAC – Programa de aceleração do crescimento

PNAB - Política Nacional de Atenção Básica

PNI - Programa Nacional de Imunizações

PSF - Programa de Saúde da Família

RNA - ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RV - rotavírus

RV-A - rotavírus do grupo A

VP - Proteína viral estrutural

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

SARS-CoV-2 - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2)

SI-PNI – Sistema de informação do Programa Nacional de Imunizações

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TEIAS - Territórios Integrados de Atenção à Saúde

TRO – terapia de reidratação oral

UFC – unidade formadora de colônia

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

UPA – Unidade de Pronto Atendimento

UPP – Unidade de Polícia Pacificadora

UTI – Unidade de terapia intensiva

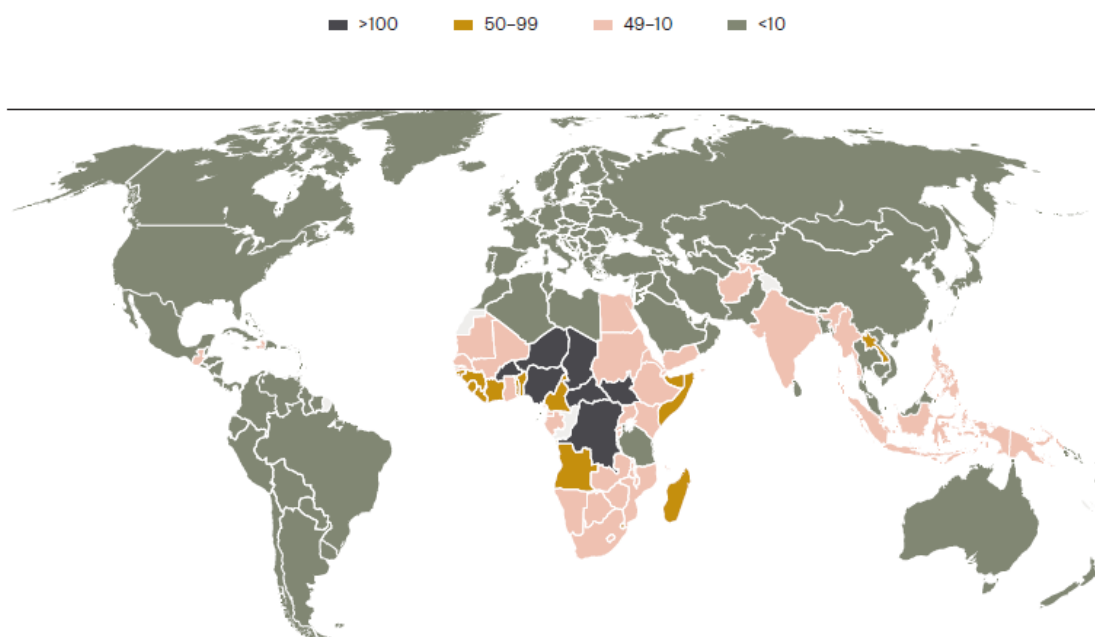
1 Revisão da Literatura

1.1 Epidemiologia

As doenças diarreicas agudas (DDA) representam importante causa de mortalidade infantil nos países de baixa renda (1) e estima-se que uma em cada oito mortes seja decorrente de gastroenterite aguda em crianças abaixo de cinco anos (2). No último relatório da rede de estudos da Carga Global de Doenças (*Global Burden of Diseases - GBD*) (3), as doenças diarreicas continuam figurando entre as cinco principais doenças em todas as faixas etárias, ocupando a terceira posição na faixa etária de 0-9 anos. No relatório do GBD de 2015 o número estimado de óbitos por doença diarreica aguda no mundo foi de 1,3 milhão, destes, 520.000 foram registrados em crianças menores de 5 anos (4).

Dentre as causas de diarreia, o rotavírus (RV) é reconhecido como o agente infeccioso mais importante de gastroenterite grave infantil no mundo, responsável por 128.515 mortes anuais e mais de 258 milhões de episódios de diarreia em crianças com menos de 5 anos de idade (5). As piores taxas de mortalidade a cada 100.000 habitantes encontram-se em países de baixa e média renda. Quatro países (República Democrática do Congo, Paquistão, Índia e Nigéria) são responsáveis por metade das mortes associadas à infecção pelo RV. E dez nações da África subsaariana têm taxas de mortalidade em crianças menores de 5 anos superior a 100 por 100.000 habitantes (6) (Figura 1).

Figura 1. Taxas de mortalidade (por 100.000) por rotavírus em crianças menores de 5 anos, por país, em 2017.

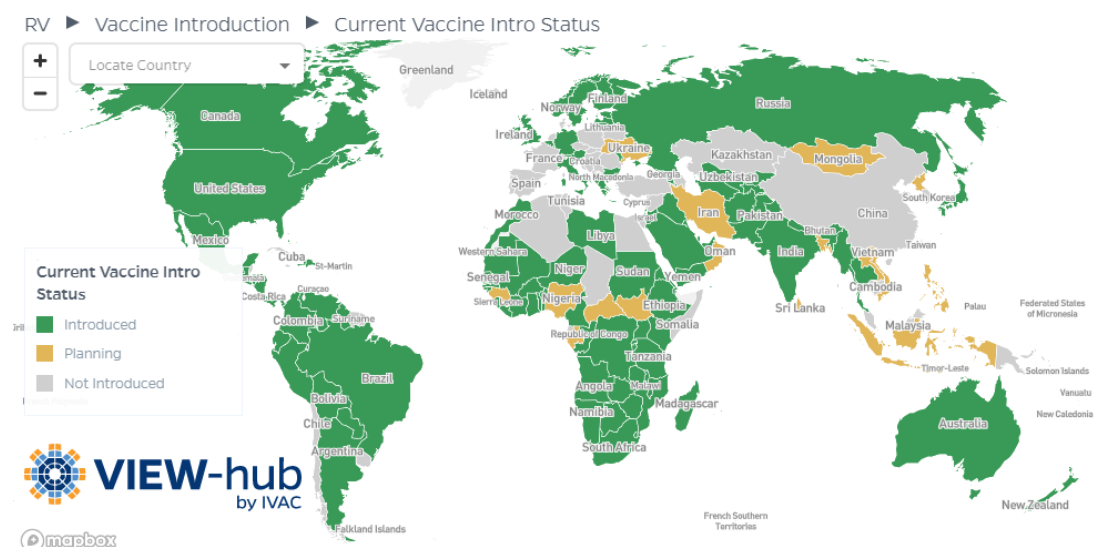


Fonte: Rota Council – The epidemiology and disease burden of rotavirus. Disponível em: <https://preventrotavirus.org/wp-content/uploads/2019/05/ROTA-Brief3-Burden-SP-1.pdf>

Dados da rede de vigilância da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que entre os anos de 2001 e 2008, cerca de 40% das hospitalizações mundiais entre crianças menores de cinco anos de idade por DDA foram atribuídas ao RV (7). Na era pré-vacinal, aproximadamente toda criança menor de cinco anos de idade já havia apresentado ao menos um episódio de diarreia por RV (8).

De acordo com informações de abril de 2020 do *Rota Council* (consórcio formado a partir de lideranças em saúde infantil em todo o mundo com intuito de promover a vacinação contra RV) 107 países, com aproximadamente 78 milhões de crianças, já introduziram vacinas contra RV em seus programas nacionais de imunização. Como resultado, há um grande e crescente conjunto de evidências demonstrando o impacto positivo destas vacinas nos países em que elas são usadas rotineiramente. Estima-se que as vacinas contra RV evitaram a morte de 800.000 a 900.000 crianças entre 2011 a 2020 (9) (Figura 2).

Figura 2. Mapa de introdução da vacina contra rotavírus (última atualização abril/2020).



Fonte: Rota Council – Rotavirus vaccine introduction and coverage. Disponível em <https://preventrotavirus.org/wp-content/uploads/2019/05/ROTA-Brief1-Introduction-SP-1-1.pdf>

Com o avanço da imunização contra o RV em vários países, as taxas de mortalidade associadas à DDA apresentaram reduções que variaram de 22 a 50% (5,10) nestas localidades. Houve declínio de 40% na prevalência do RV nas nações participantes da *Global Rotavirus Surveillance Network*, coordenada pela OMS, desde 2008 (11). Apesar da implementação bem-sucedida da vacina em mais de 100 países (12–14), ainda encontramos áreas com elevada prevalência do RV, o que pode ser explicado por fatores como baixa cobertura vacinal, alta carga basal da doença causada pelo RV ou baixa prevalência de outros patógenos causadores de infecção gastrointestinal (11). A redução mais acentuada na proporção de mortes por diarreia associada ao RV - de 36% em 2000 para 26% em 2013 - ocorreu na América Latina, onde quase todos os países incluíram a vacina em seus programas nacionais de imunização (6). Ainda assim, nos países de renda baixa e média fora do continente americano, o RV permanece na liderança entre as causas de gastroenterite grave que resultam em hospitalização de crianças menores de cinco anos (11).

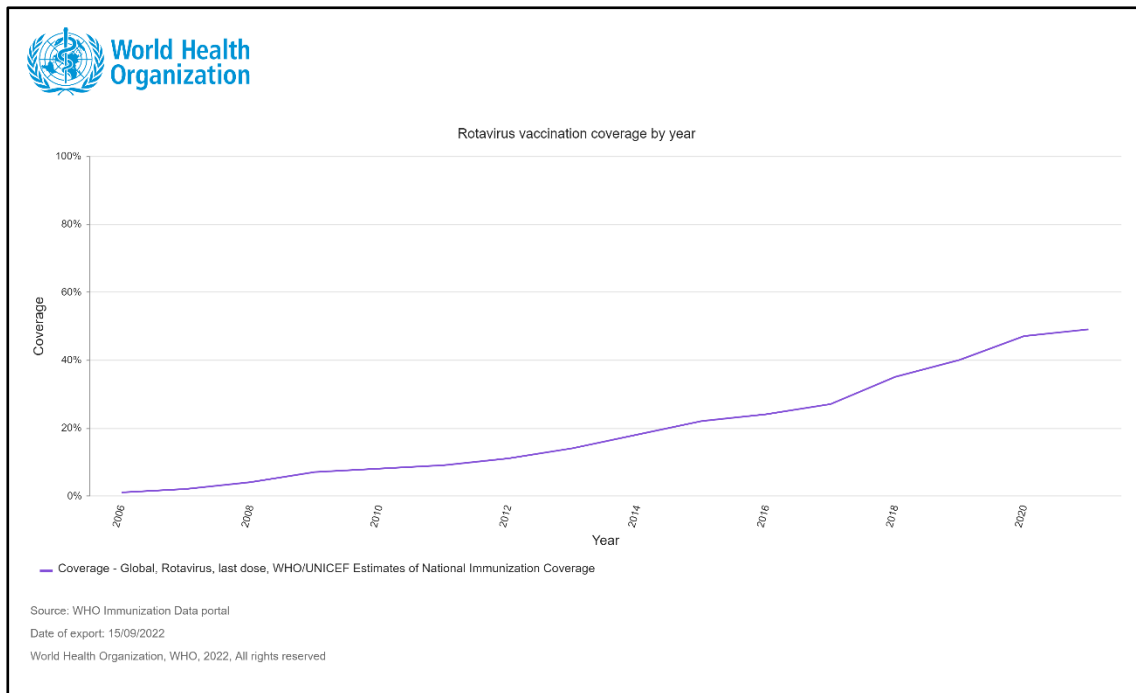
No Estado do Rio de Janeiro, uma análise da mortalidade atribuída à gastroenterite aguda, de séries temporais dos anos 1980-1998 (período anterior à

vacinação contra o RV), indicava um pico da doença nos meses mais secos do ano (março a setembro), sugerindo que o RV pudesse ter papel importante na etiologia dos óbitos associados à DDA (15).

Paradoxalmente, mesmo antes da introdução da vacina contra o RV no Programa Nacional de Imunizações (PNI), já era possível observar uma tendência de queda no número de mortes por diarreia no Brasil. A redução consistente das taxas de mortalidade na infância por diarreia, a partir da década de 1980, tem como pano de fundo campanhas intensas para utilização da terapia de reidratação oral com a participação de órgãos como o Ministério da Saúde, Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), Sociedade Brasileira de Pediatria, e da fundamental atuação da Pastoral da Criança em comunidades carentes (16). A criação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1988, com a implementação posterior do Programa de Saúde da Família (PSF), facilitou o acesso da população à assistência primária à saúde principalmente em municípios e comunidades de baixa renda de áreas urbanas. Outras estratégias nacionais de Saúde Pública como o estímulo ao aleitamento materno, melhora do saneamento básico, distribuição de água para os municípios e suplementação de vitamina A contribuíram nos últimos anos para a redução da mortalidade infantil, especialmente a fração relacionada à diarreia (17–19). No intervalo temporal de 1990 a 2015, a mortalidade relacionada à diarreia apresentou redução de 94,7%, saindo da posição de 2ª maior causa de mortalidade em menores de cinco anos em 1990 para a 7ª posição em 2015 (20).

Desde 2009 a OMS recomenda a inclusão de vacinas contra o rotavírus nos programas de imunização de todos os países, reiterando a recomendação em 2013 e em 2021 (21–23). Apesar disso, os dados da OMS e Unicef sobre coberturas vacinais mostram que, mesmo depois de 14 anos da introdução das primeiras vacinas contra o RV, menos da metade das crianças no mundo foram vacinadas (Figura 3).

Figura 3. Cobertura vacinal anual da vacina contra rotavírus no mundo.

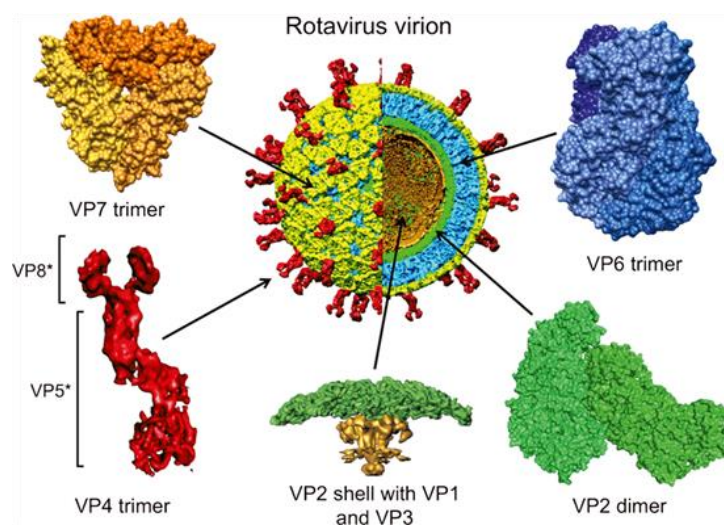


Fonte: <https://immunizationdata.who.int>. Acesso em 15/09/2022.

1.1.1 Estrutura do vírus, classificação e diversidade dos genótipos

Os rotavírus são vírus icosaédricos não-envelopados, membros da família *Reoviridae*. O rotavirion possui uma estrutura capsídica de camada tripla, não-envelopada e complexa, que envolve o genoma composto por 11 moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de fita dupla, que codificam seis proteínas virais estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não-estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (24), cada uma destas codificadas em um segmento genômico exclusivo, com exceção das proteínas não-estruturais 5 e 6 (NSP5 e NSP6) (25) (Figura 4). As principais propriedades antigênicas, de ligação à superfície celular, entrada do vírus na célula, transcrição de RNA e produção de resposta imune são determinadas pelas proteínas do capsídeo viral (VPs) (26). As proteínas não-estruturais são produzidas durante a infecção para facilitar a replicação viral e a patogênese (27).

Figura 4. Estrutura e localização dos componentes proteicos do vírion do rotavírus.



Fonte: *International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV)*. Disponível em <https://ictv.global/report/chapter/sedoreoviridae/sedoreoviridae/rotavirus>. Acesso em 20/09/2022.

A descrição inicial dos rotavírus, baseada na patologia e epidemiologia, ocorreu a partir de cepas de murinos, classificadas genericamente como agentes responsáveis pela diarreia epizootica de ratos jovens, na década de 1940 (28). A correlação entre estes vírus e a doença diarreica aguda grave em lactentes foi relatada pela primeira vez por Bishop, na década de 1970 (29), que utilizou a microscopia eletrônica para examinar biópsias de mucosa duodenal de crianças com DDA. O vírus foi descrito como partículas de 70nm com aspecto de roda, sendo, por esta razão, denominado de rotavírus em 1974 (30). Quatro anos depois, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus aceitou oficialmente a nomenclatura. A partir de então, a detecção do rotavírus em diferentes espécies de animais fez com que ele passasse a ser reconhecido como agente patogênico capaz de infectar humanos e animais em todo o mundo (31).

Em 1977, Linhares e cols. publicaram uma nota informando sobre o achado de partículas virais através de microscopia eletrônica com a aparência típica de duovírus, nomenclatura do rotavírus à época, nas fezes de 2 crianças com gastroenterite em Belém do Pará, Brasil (32).

O gênero Rotavírus compreende oito espécies designadas de A a H com base na sequência de aminoácidos da proteína VP6, divisão proposta pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (33). A metagenômica viral têm contribuído amplamente para a compreensão da diversidade genética, e espécies provisórias como Rotavírus I e J foram propostas mais recentemente (34,35).

O rotavírus do grupo A (RV-A) é o grupo responsável por mais de 90% das infecções gastrointestinais em humanos (33), sendo detectado em uma ampla variedade de mamíferos e aves. Os grupos B e C também são associados à doença em humanos, porém em menor escala. Já em mamíferos, as formas endêmicas e epidêmicas de infecções por rotavírus B, C, E e H foram descritas, enquanto os rotavírus D, F e G foram identificados apenas em aves (24,36,37).

A classificação dos rotavírus é realizada a partir do sistema de genotipagem G/P, baseado na análise de genes da glicoproteína VP7 (tipo G) e proteína VP4 (tipo P) que induzem a produção de anticorpos neutralizantes durante o curso da infecção. Estas proteínas estão presentes no capsídeo viral externo (38).

Com a utilização de sistema binário, diversas combinações G/P são possíveis para classificar os genótipos do RV-A. Até recentemente, pelo menos 36 genótipos G e 51 genótipos P foram descritos, segundo o “*Rotavirus Classification Working Group*” (39). Vários trabalhos demonstram a existência de mais de 70 combinações G-P diferentes, entretanto, as mais frequentemente identificadas no mundo são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (40,41). Para designar a composição genética completa do vírus, em abril de 2008 Matthijnssens et al (42), propuseram a nomenclatura esquemática: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx representando os genótipos e os 11 respectivos segmentos de genes que codificam VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, sendo x o indicador do número do genótipo. A maioria dos genomas de RV humanos pertencem a duas constelações de genótipos: Wa-like (genogrupo 1: G1/3/4/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) e DS-1-like (genogrupo 2: G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2). Um terceiro genogrupo, AU-1-like, também é detectado em humanos, embora com menos frequência (genogrupo 3: G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) (33).

1.1.2 Vias de exposição e transmissão

A transmissão dos rotavírus se dá pela via fecal-oral, após exposição a inóculos pequenos (10^2 UFC/g de fezes) e com período de incubação de menos de 48 horas (43). Os vírus são eliminados nas fezes em concentrações extremamente elevadas (10^{11} UFC/g de fezes) pelos indivíduos sintomáticos e mantêm sua infectividade por muitos meses em temperatura ambiente, sendo detectados prontamente nas superfícies dos ambientes (44). A excreção fecal do vírus dura aproximadamente 10 dias; um estudo com coletas sistemáticas de fezes demonstrou que cerca de 1/3 de crianças imunocompetentes com infecção pelo RV continuaram excretando o rotavírus nas fezes, detectado através de exame de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), por mais de 21 dias (45).

A disseminação fecal é facilitada principalmente por reservatórios ambientais, como fluidos, alimentos, mãos e fômites e por meio de interações de humanos ou animais com seus respectivos ambientes. Além disso, moscas também podem espalhar o RV das fezes contaminadas para superfícies (46).

A exposição frequente de crianças suscetíveis em creches e casas de cuidadores facilita a transmissão do vírus. A detecção do rotavírus em recipientes para descarte de fraldas, brinquedos, torneiras, trocadores de fraldas, áreas de lavagem das mãos e até mesmo em áreas de preparação de alimentos são sugestivos de seu alto potencial de disseminação na maioria destes locais (47).

Rotavírus de origem animal podem infectar humanos por transmissão direta do vírus ou através da contribuição de um ou mais segmentos de RNA genômico que formam rearranjos com constelações de genes de origem humana e animal (48). Atualmente, alguns genótipos incomuns de RV identificados em humanos resultaram da transmissão animal-humano (49). O rotavírus continua sendo uma causa importante de diarreia em animais selvagens (lhamas, girafas), animais de fazenda (porcos, ovelhas e vacas), roedores, pássaros e animais domésticos (gatos e cães) em todo o mundo, e a disponibilidade destes hospedeiros representa um reservatório potencial para troca genética com cepas de rotavírus humanos (50).

1.1.3 Patogênese

- Entrada do vírus na célula e sítio primário de replicação:

A estrutura de tripla camada do capsídeo viral confere estabilidade ao vírus e facilita a transmissão fecal-oral sem inativação nos dois terços superiores do intestino delgado, cujo epitélio viloso absorptivo é o alvo de infecção dos rotavírus (24). A ligação é um processo complexo, mediada pela proteína *spike* VP4 através do domínio VP8 e receptores específicos do hospedeiro (sialoglicanas) e correceptores. Estudos recentes propuseram que os antígenos de histogrupos sanguíneos (HBGAs) servem como receptores de fixação dos RV (27,51). A interação via antígenos de histogrupos sanguíneos (HBGA) com hemácias, secreções mucosas e epitélios é influenciada por um genótipo P específico (52). Os HBGA são glicanos complexos, catalisados por glicosiltransferases através da adição de uma série de monossacarídeos a um precursor inicial. A expressão da enzima é controlada pelos genes AB0, FUT2 (secretor) e FUT3 (Lewis), e estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram sua presença como marcador de suscetibilidade do hospedeiro a várias doenças infecciosas, incluindo a infecção pelo RV (53).

Após a captação celular, a replicação do rotavírus e sua montagem ocorrem em viroplasmas citoplasmáticos, e novos vírus produzidos são liberados das células através de lise celular ou por transporte vesicular independente do complexo de Golgi (27).

1.1.4 Resposta imunológica

A infecção pelo RV pode produzir tanto resposta celular quanto humoral e, após o primeiro episódio de infecção, observa-se a produção precoce de imunoglobulina M (IgM) seguida da produção de IgG e IgA; a IgA também é produzida localmente no intestino (54).

A resposta sorológica homotípica costuma ser direcionada contra um genótipo viral específico (55). Normalmente, confere proteção de curta duração e imunidade contra infecções futuras nas formas graves da doença (56,57). Infecções subsequentes produzem uma resposta mais ampla e heterotípica (57–59). Entretanto,

não está claro se apenas a presença de anticorpos neutralizantes seria suficiente para a proteção do indivíduo, mesmo com títulos suficientemente elevados (58), visto que vários casos de infecção sintomática sequencial já foram relatados (58,60–63)

Os anticorpos neutralizantes podem ser detectados após a infecção ou vacinação. Eles são direcionados para os epítomos encontrados nas proteínas VP4 e VP7, localizadas na superfície externa do capsídeo viral (54).

Nas crianças infectadas pelo RV, as respostas dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ocorrem principalmente através de respostas Th1 e, às vezes Th17, através de citocinas pró-inflamatórias, especialmente interferon e interleucina-17 (52).

A resposta imune celular através das células T e macrófagos, fornece resistência contra a reinfecção a partir da produção de citocinas. Esta resposta pode permitir que o hospedeiro contenha ou elimine o vírus, bem como proteja o hospedeiro na fase aguda, antes que outros aspectos da resposta imune, como os anticorpos séricos, entrem em ação (52).

Em um estudo realizado com lactentes e adultos com o objetivo de avaliar a atividade linfoproliferativa relativa à infecção pelo RV, identificou-se que esta resposta ocorreu simultaneamente ao aumento dos níveis de anticorpos em quase 40% dos casos. Nos lactentes, a resposta de células T foi fraca e declinou pouco tempo após a infecção. Já nos adultos, foi observada resposta proliferativa robusta das células T ao RV, provavelmente decorrente de reinfecções prévias. Os dados sugerem que a infecção pelo RV induz resposta sistêmica linfoproliferativa forte e consistente que só se desenvolve após vários episódios de infecção (64).

No geral, parece que os efetores imunes têm funções sobrepostas, e a proteção contra o rotavírus é provavelmente reforçada por essa redundância (56).

1.1.5 Manifestações clínicas

A gravidade do quadro clínico é idade-dependente. Apesar da infecção pelo RV ocorrer em qualquer idade, a incidência da doença com sinais e sintomas clínicos de maior gravidade acomete principalmente lactentes entre seis e 24 meses de idade (56,66).

As infecções pelos RV podem ser assintomáticas, o que sugere que, tanto fatores relacionados ao vírus quanto fatores do hospedeiro podem afetar a gravidade da doença. Em relação ao hospedeiro, a desnutrição é bem documentada como um fator de risco para diarreia mais grave devido à recuperação lentificada do epitélio intestinal e pela resposta inflamatória modificada do hospedeiro (25). Recém-nascidos podem ser infectados e apresentarem doença assintomática, o que já foi identificado de forma endêmica em algumas localidades (67–69). Estas infecções no período neonatal parecem estar associadas à redução da morbidade nas infecções subsequentes pelos RV (60,67,70). Os fatores para a gravidade reduzida da doença antes dos 6 meses e após os primeiros anos de vida continuam sendo objeto de estudo. Possivelmente, alterações não imunológicas e idade-dependentes que ocorrem no intestino, inclusive uma redução dos receptores específicos dos rotavírus nos enterócitos, podem contribuir para menor gravidade da doença nessa faixa etária (25).

A concentração diminuída de proteases necessárias para clivar a proteína antigênica VP4 nas secreções intestinais de recém-nascidos em relação às crianças mais velhas também poderia explicar a resistência dos recém-nascidos à doença pelos rotavírus. O aumento da incidência da doença em lactentes coincide com o declínio dos títulos de anticorpos maternos IgG (25).

- Sintomas gastrointestinais:

A doença tem espectro clínico amplo, podendo se apresentar apenas com episódios transitórios de fezes amolecidas até gastroenterite grave com desidratação, distúrbios hidroeletrólíticos, choque e óbito. Nas apresentações típicas, após período de incubação de 1 a 3 dias, a doença tem início abrupto com febre e vômitos incoercíveis, seguidos de diarreia aquosa explosiva, raramente com presença de sangue vivo, já que o RV não é um patógeno que causa doença invasiva (71). A diarreia dura de 5 a 6 dias, os vômitos de 1 a 3 dias e a febre não se prolonga por mais de 48 horas, na maioria dos casos (71). Outros sintomas associados com a infecção também podem ocorrer como náuseas, anorexia, cólicas e mal-estar. Os sintomas gastrointestinais tendem a desaparecer dentro de 3 a 7 dias, mas podem persistir por até 2 a 3 semanas (22).

Ao aderirem ao epitélio intestinal, os rotavírus possuem diversos mecanismos que contribuem para a fisiopatologia da diarreia. São eles:

a) A entrada do vírus nos enterócitos maduros causa destruição do epitélio basal das vilosidades intestinais levando à atrofia, perda das microvilosidades, infiltração de células mononucleares, ingurgitamento do retículo endoplasmático e mitocondrial dos enterócitos e perda de enzimas intestinais do bordo em escova (maltase, sacarase e lactase), levando à intolerância transitória de D-xilose e lactose durante o período da infecção aguda. Conseqüentemente, ocorre má-absorção de nutrientes, eletrólitos e água pelo intestino, com aumento da pressão osmótica no lúmen e aparecimento de diarreia. Esta característica é atribuída à proteína NSP4 (25,72).

b) A enterotoxina NSP4 secretada pelas células infectadas mediam a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, resultando em concentrações aumentadas deste íon no meio intracelular, causando a disrupção da estrutura do citoesqueleto e lise celular através da ativação de canais de cloreto cálcio-dependentes (25,38). Adicionalmente, este desequilíbrio eletrolítico cria um gradiente osmótico que facilita o transporte de água para o lúmen intestinal, levando à diarreia secretora (27).

c) A NSP4 também altera a biogênese e integridade das junções dos enterócitos com conseqüente saída de água e eletrólitos (25,38).

d) A infecção leva à desregulação da bomba de sódio e potássio que é essencial para a retenção de fluidos e nutrientes das células. Isto ocorre pela diminuição da expressão das enzimas digestivas após a infecção pelos rotavírus (25,38).

e) O aumento da concentração de cálcio intracelular mediado pela NSP4 induz a secreção de 5-hidroxitriptamina (5-HT) também chamada de serotonina de células enteroendócrinas em humanos. Este produto químico desencadeia a ativação de nervos entéricos no intestino delgado, aumentando assim a motilidade intestinal, também associada ao início da diarreia (25,38).

Os mecanismos que desencadeiam o vômito, que ocorre precocemente durante a infecção, podem resultar da liberação precoce de citocinas que agem no sistema nervoso central ou pelo esvaziamento gástrico retardado. Se este último é resultado de um aumento nos hormônios gastrointestinais (por exemplo, secretina, gastrina e colecistocinina) ou ativação dos nervos vagais associada à infecção por rotavírus, ainda permanece incerto (73).

- Sintomas sistêmicos:

A infecção pelo RV pode ser acompanhada de febre e é comumente associada a mal-estar.

Sinais e sintomas respiratórios podem ser observados em até 50% das crianças com infecção pelo RV; não está muito claro se a presença destes sintomas é decorrente da infecção ou resultado da acidose metabólica decorrente da desidratação grave (56).

-Sintomas extra-intestinais:

O RV pode causar infecção sistêmica através da corrente sanguínea, embora os mecanismos da infecção extra intestinal não estejam suficientemente elucidados (74). A detecção de antigenemia e viremia no soro foi relatada em crianças com infecção por RV, e a sua replicação em sítios extra intestinais, embora limitada, pode ocorrer (74). Ainda que haja evidências de que a infecção intestinal possa evoluir para uma infecção sistêmica, evidências diretas e achados patológicos específicos no hospedeiro infectado precisam ser melhor demonstrados (27).

Complicações neurológicas podem ocorrer em um pequeno percentual (2-3%) de lactentes jovens com gastroenterite pelo RV, sendo a convulsão a manifestação mais comum. As convulsões podem estar associadas à febre, evento comum na infecção pelo RV; ou a distúrbios hidroeletrolíticos decorrentes da diarreia osmótica (75). Menos frequentemente, o RV pode causar encefalite aguda ou encefalopatia (76,77).

Rivero-Calle (78) e Gómez-Rial (79) têm advogado que a infecção pelo RV foi, por muitos anos, subvalorizada e permaneceu como uma condição limitada apenas ao trato gastrointestinal. Em seus trabalhos eles reforçam que a infecção pelo RV é uma doença sistêmica com implicações clínicas e fisiopatológicas além do intestino. Propõem inclusive um modelo esquemático de “iceberg” para demonstrar que a patologia possui implicações clínicas quase ocultas fora do trato gastrointestinal e, eventualmente, desencadeiam o desenvolvimento de doenças autoimunes (79). Na revisão da literatura feita por O’Ryan (72), várias síndromes clínicas associadas temporalmente à gastroenterite pelo RV foram observadas e descritas na literatura, como por exemplo a enterocolite necrosante em recém-nascidos, intussuscepção,

atresia biliar, *diabetes mellitus*, convulsões e sintomas gastrointestinais protraídos. Entretanto, a causalidade entre o RV e estas manifestações permanece incerta.

1.1.6 Achados laboratoriais

Geralmente não há alterações laboratoriais específicas. Alguns exames são úteis para identificação de complicações circunstanciais como acidose metabólica, distúrbios hidroeletrólíticos e em situações em que ocorra intolerância grave e/ou prolongada à lactose. Nos casos que evoluem com desidratação grave, pode ocorrer aumento de escórias nitrogenadas e acidose metabólica. A hipernatremia geralmente indica gravidade do grau de desidratação (80,81). Hipocalcemia foi relatada em estudo com recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva com diarreia grave causada pelo RV (82).

A leucometria não costuma estar alterada nos casos não complicados, o que pode ajudar a diferenciar a infecção pelo RV de outras causas bacterianas de gastroenterite onde há neutrofilia com desvio para esquerda (72). Elevação discreta de aspartato aminotransferase tem sido relatada durante a doença aguda sem corresponder necessariamente à injúria hepática; esta alteração pode ser decorrente de lesão das células epiteliais intestinais durante a gastroenterite (83).

1.1.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção envolve a detecção do RV nas fezes frescas de pacientes sintomáticos. Nos primeiros trabalhos epidemiológicos de RV, a microscopia eletrônica era utilizada para sua identificação; a visualização de grande número de partículas com aspecto característico de rotavírus nas fezes confirmava o diagnóstico (56). Esta técnica é considerada cara, trabalhosa e requer profissionais altamente qualificados. Pela necessidade de realização de diagnóstico em grandes quantidades de amostras, os testes imunoenzimáticos para identificação de antígeno viral nas fezes (ELISA ou teste de aglutinação pelo látex) substituíram a microscopia eletrônica e tornaram-se uma opção rápida e de fácil execução, úteis em cenários de recursos escassos (52). Já os testes moleculares (reação em cadeia da polimerase –

RT-PCR) permitem a detecção do RNA na amostra clínica sendo, portanto, mais sensível do que a detecção de antígeno (52,72). Ensaios de RT-PCR em tempo real desenvolvidos para a identificação de alvos vacinais específicos da Rotarix® e Rotateq® permitem a detecção do vírus vacinal nas fezes de indivíduos vacinados (84,85) diferenciando-os do vírus selvagem. Essa diferenciação é importante para evitar a superestimação de diagnósticos de RV sem necessariamente haver aumento do número de casos de infecção (86).

O sequenciamento de VP7, VP4 e de outros segmentos do genoma é necessário para a genotipagem dos RV circulantes. Os ensaios mais recentes de RT-PCR em tempo real, especialmente os ensaios TaqMan®, têm sido utilizados para superar os desafios da RT-PCR convencional e do sequenciamento. Comparada com outros métodos, a RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) em tempo real tem vantagens pela maior especificidade e sensibilidade apresentadas na genotipagem (52).

Para caracterização completa do genoma de RV e identificação de constelações de genótipos incomuns, a análise do genoma completo através do método Sanger foi recentemente recomendada pelos grupos de trabalho de classificação de RV (52).

A cultura celular é um método altamente sensível, porém é caro, laborioso e pouco prático na rotina clínica (52).

1.1.8 Tratamento

Não há medicamento antiviral disponível para tratamento da infecção pelo RV. O tratamento da gastroenterite pelo RV deve abordar, essencialmente, a hidratação (prevenção da desidratação ou correção de distúrbios hidroeletrólíticos no paciente desidratado), a manutenção da dieta adequada para a idade para aqueles que não estão vomitando e não estão desidratados, e alívio dos sintomas (71).

A terapia de reidratação oral (TRO) utilizando a solução preconizada pela OMS (87) é a primeira escolha nos casos em que não há desidratação grave e choque. Nestas situações deve ser instituída a hidratação intravenosa.

A alimentação oral precoce incluindo o aleitamento materno, é recomendada visto que auxilia na reparação da mucosa intestinal após infecção por RV. A introdução

da dieta regular poucas horas após a reidratação, ou a manutenção da dieta durante a diarreia sem desidratação encurtam a duração da doença (88).

1.1.9 Imunização

Em 2009, a OMS recomendou a inclusão da vacina contra o RV em programas de imunização de todos os países, com ênfase na introdução em países onde a mortalidade por diarreia fosse responsável por mais de 10% da mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. Essa recomendação foi reiterada em 2013 e 2021 (21–23).

Atualmente quatro vacinas orais pré-qualificadas pela OMS estão disponíveis para uso: Rotateq[®] (Merck & Co. Inc.), Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals), ROTAVAC[®] (Bharat Biotech) e ROTASIL[®] (Serum Institute of India) (23).

Rotarix[®] é uma vacina monovalente, contendo a cepa de rotavírus humano RIX4414 vivo atenuado, com especificidade genotípica para G1P[8] (89). Ela mimetiza a infecção natural pelo RV, com replicação do vírus vacinal no intestino (90). Foi inicialmente licenciada em 13 países da América Latina e o Brasil foi o primeiro país do continente a incorporá-la ao PNI do Ministério da Saúde, em março de 2006. No calendário brasileiro, a vacina é aplicada em esquema de duas doses, a primeira dose administrada a lactentes entre 6 a 14 semanas de vida e a segunda, administrada entre 14 a 24 semanas. O intervalo mínimo recomendado entre a primeira e a segunda dose é de 4 semanas. Devido à presença das proteínas específicas G1 e P[8], a imunização com Rotarix[®] pode induzir resposta protetora homotípica contra os genótipos de RV-A mais prevalentes. Alguns estudos sugerem que Rotarix[®] também previne a diarreia causada pelo genótipo G2P[4] ao induzir resposta heterotípica, mas possivelmente menos eficaz em países de baixa renda quando comparados com os de renda elevada (14,91–93).

Após a imunização, o vírus vacinal é eliminado nas fezes (94,95) e pode ser transmitido a indivíduos não vacinados (39,96,97). Esse fenômeno se assemelha à vacina oral contra a poliomielite (98) e, embora potencialmente benéfico por aumentar o contato com a cepa vacinal no nível comunitário, também pode produzir infecções sintomáticas principalmente em recém-nascidos e bebês que ainda não têm idade

suficiente para receber a primeira dose da vacina (<6 semanas). A potencial transmissão do vírus vacinal para prematuros em unidades de terapia intensiva neonatal é o principal motivo para o adiamento da vacinação nestes ambientes. De acordo com o Manual dos Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais (CRIE) do Ministério da Saúde, as vacinas do PNI poderão ser aplicadas em unidades neonatais se o recém-nascido atingir a idade cronológica apropriada para a vacinação, segundo o calendário nacional. A única exceção à esta recomendação é a vacina atenuada contra rotavírus (99). Em estudo de revisão da literatura, Sicard e cols. (100) não evidenciaram a transmissão horizontal do vírus vacinal entre lactentes internados em unidades neonatais onde a vacina contra rotavírus foi aplicada, quando medidas de precaução de contato foram adotadas. Os autores apontam que o risco teórico de transmissão em uma unidade de terapia intensiva neonatal precisa ser ponderado levando-se em conta a proporção de lactentes que deixarão de ser imunizados, já que ficarão expostos ao risco de infecção potencialmente grave pelo vírus selvagem. Como a vacina tem limites superiores rígidos de administração, adiar a primeira dose da vacina até a alta da unidade neonatal significa deixar uma parcela de lactentes desprotegidos. Mais recentemente, o grupo consultivo estratégico de imunização da OMS recomendou que bebês prematuros hospitalizados sejam vacinados contra RV quando atingirem a idade cronológica que os tornem aptos a receber o imunizante (23).

Ainda é controverso se o uso disseminado das vacinas atenuadas orais contra o RV causaria pressão seletiva nos rotavírus humanos, disparando alterações genéticas e antigênicas que resultariam na emergência de um genótipo cujas vacinas teriam menor efetividade (101).

A heterogeneidade genética do RV pode ser gerada e impulsionada por quatro mecanismos distintos (102):

- a) acúmulo de mutações pontuais, devido à natureza propensa a erros das RNA-polimerases dependentes do RNA viral;
- b) rearranjo dos 11 genes do RV, devido à natureza segmentada do genoma do vírus;
- c) rearranjos de genes, como deleções, duplicações (parciais) e inserções nas regiões genéticas não codificantes (baixa probabilidade em comparação com os dois primeiros mecanismos); e,

d) introdução de genes de RV animal na população de RV humano através da transmissão direta do vírus do animal para o hospedeiro humano. O rearranjo entre uma cepa de RV humano e de uma cepa animal pode resultar em um vírus quimérico, com capacidade de se disseminar com sucesso na população humana.

A variação na circulação dos genótipos ao longo do tempo é um fenômeno bem documentado, independente da ação exercida pelas vacinas, conforme descrito por vários autores (103,104) haja vista que os genótipos costumam ser substituídos por outros periodicamente. Esta variação provavelmente ocorre pela ecologia natural dos RV que não é homogênea nas diferentes regiões do mundo (91).

O principal desafio à eficácia das vacinas desenvolvidas é o mecanismo de evolução dos RV. Os genótipos G/P associados com doença em humanos podem flutuar enormemente, fenômeno que pode estar relacionado com a presença e o comportamento de genogrupos distintos de RV (102,105). A diversidade de genótipos detectada em rastreamentos em todo o mundo é observada, sobretudo, nos países com grande desigualdade econômica. Isto, associado à possibilidade da emergência de genótipos infrequentes e à disseminação destes que podem tornar-se epidemiologicamente relevantes em algumas localidades, justifica a vigilância contínua de RV em lactentes com e sem DDA (38).

Leite e cols. (40), em uma revisão sobre a distribuição dos genótipos no Brasil entre 1986 e 2007, período que englobava apenas um ano de utilização da Rotarix® no país, mostraram a circulação de três diferentes genótipos - G5P[8], G9P[8] e G2P[4]. No último ano do estudo, G2P[4] cuja prevalência havia caído entre o primeiro e o segundo período da análise, reemergiu a partir de 2006, um fenômeno continental segundo os autores.

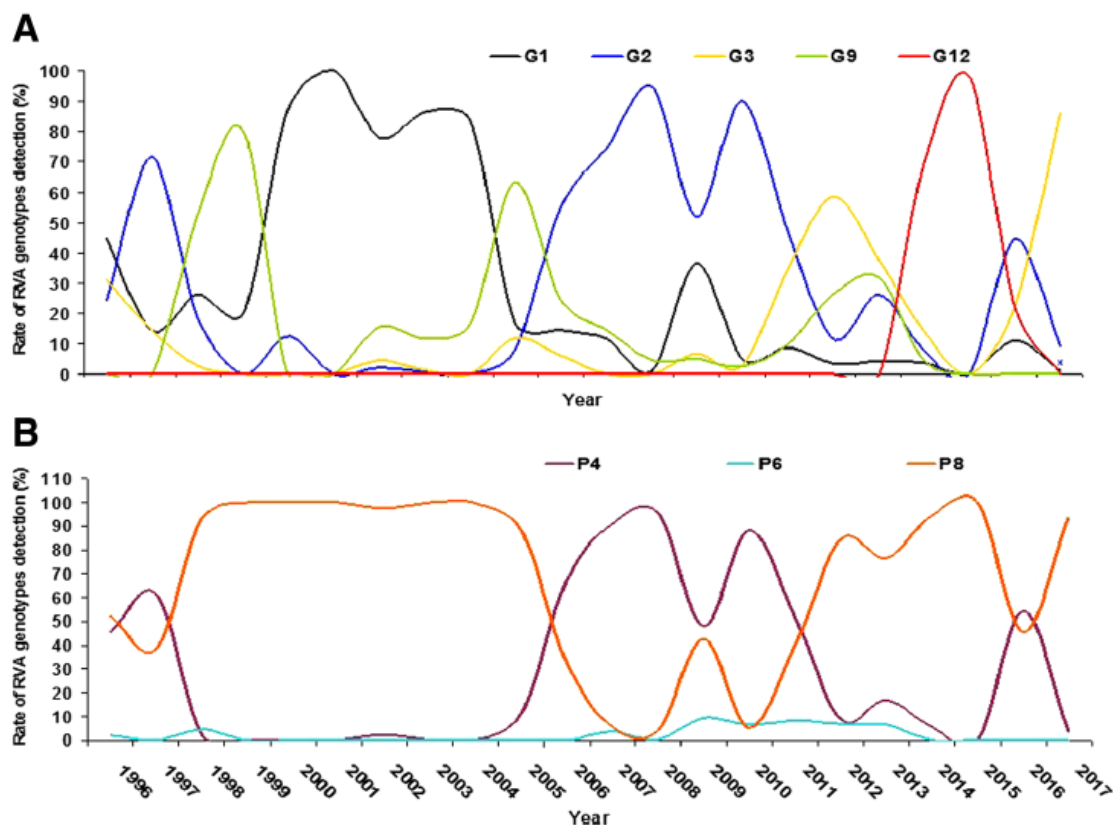
Carvalho-Costa e cols. (106) em estudo de vigilância sentinela realizado em um hospital municipal infantil do Rio de Janeiro, descreveram as mudanças ocorridas na distribuição dos genótipos de rotavírus durante a implementação da vacina, constatando também a emergência do genótipo G2P[4]. Posteriormente, esta tendência foi demonstrada em nível nacional através de vigilância de base laboratorial, que incluiu a análise de 6.109 amostras de fezes obtidas de pacientes com DDA (107).

Em estudo de revisão, Santos e cols. (91) identificaram queda na taxa de isolamento de rotavírus em crianças antes e após a introdução da vacina monovalente

no calendário nacional de imunização brasileiro em 2006. A taxa de positividade do RV que antes da introdução da vacina era de 22,4% caiu para 11,6% após a introdução da vacina. O genótipo G1P[8] foi encontrado nas cinco regiões do país antes e após a introdução do imunobiológico. Outros genótipos identificados antes de 2006 no país foram G5P[8], G9 com P[8] ou P[4], G4 com P[8] ou com P[6], G12P[8] e G2P[4]. A prevalência de G1P[8] no período pré-vacinal era de 43%. Após a introdução da vacina, o genótipo G2P[4] apresentou aumento na frequência de detecção.

Carvalho-Costa e cols. (14), em estudo baseado em dados de laboratório de referência para a vigilância dos rotavírus, avaliaram resultados de amostras de fezes diarreicas coletadas de crianças com quadro de DDA, no período de 1996 a 2017, anos anteriores e posteriores à introdução da vacina monovalente. A taxa de detecção do RV diminuiu de forma significativa em crianças até 2 anos de idade após o início da imunização universal (de 29% para 18,7%), e foi identificada também a alteração na circulação dos genótipos, com queda de G1P[8] e G9P[8], e maior circulação de G2P[4], G3P[8] e G12P[8], conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Distribuição dos genótipos de RV-A no Brasil antes e após introdução da vacinação com Rotarix® em 22 estados brasileiros. Dados do monitoramento realizado pelo Laboratório de Referência Regional em Rotavírus (LRRR)/Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).



Fonte: Adaptado de Carvalho-Costa e cols. (*BMC Pediatr.* 2019).

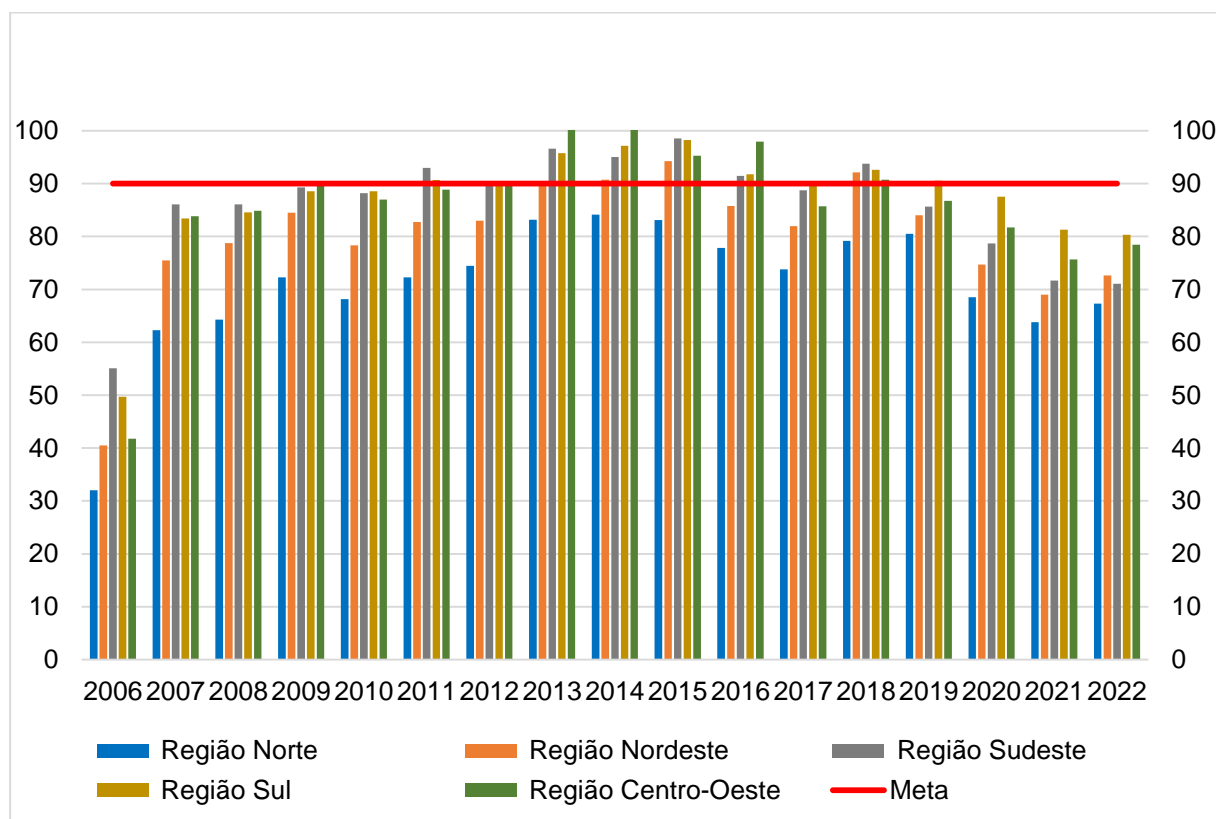
Embora as vacinas contra rotavírus humanos licenciadas tenham demonstrado alta eficácia em regiões com renda elevada, estudos de resposta vacinal com crianças da região Subsaariana da África têm demonstrado uma reduzida eficácia (108,109). A razão ainda é desconhecida, mas acredita-se que a resposta imunológica diminuída esteja relacionada a fatores como: desnutrição, outras infecções concomitantes, diversidade dos rotavírus, fatores genéticos do hospedeiro, enteropatia ou disbiose do microbioma intestinal (110).

As variações identificadas em diversos estudos (14,38,91) reforçam a necessidade de vigilância permanente dos RV com o intuito de monitorar a emergência de genótipos não usuais e avaliar a eficácia da imunização.

1.1.10 Cobertura vacinal

Assim como tem sido observado no Brasil para todas as vacinas que fazem parte do PNI, a cobertura vacinal para Rotarix® reduziu drasticamente nos últimos três anos. Chegou a alcançar 95,3% em 2015 caindo para 85,4% em 2019. Em 2021, já sob o efeito da pandemia de COVID-19, a cobertura foi de 72,3% de acordo com os dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde (SI-PNI/MS), tabulados pelo Datasus (<http://tabnet.datasus.gov.br>). No Brasil, há relativa heterogeneidade geográfica em relação à cobertura da Rotarix®, que é substancialmente menor na região norte do país (Figura 6).

Figura 6. Coberturas vacinais da vacina contra rotavírus no Brasil, 2006-2022.



Fonte: Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em 06/01/2023.

A queda das coberturas vacinais no Brasil vem preocupando os profissionais de saúde antes mesmo da pandemia causada pelo SARS-CoV-2. O retorno do sarampo em 2018 e a ameaça de reemergência da poliomielite, são consequências diretas das baixas coberturas.

Alguns fatores são apontados por especialistas como possíveis causas para este fenômeno (111). Dentre eles, destacam-se:

- Desabastecimento de imunizantes nas unidades de atenção primária à saúde.
- Falsa segurança promovida pela eliminação de doenças comuns no passado. Com o aumento das coberturas vacinais, essas doenças tornaram-se desconhecidas de pais mais jovens, e deixou de ser uma preocupação, com conseqüente relaxamento da vacinação dos seus filhos.
- Complexidade do calendário vacinal: com um grande elenco de vacinas disponíveis pelo PNI, muitas delas com múltiplas doses, não é incomum as pessoas acharem que estão em dia com a sua imunização. Daí a importância da avaliação da caderneta vacinal durante as consultas, não só de lactentes como também de crianças maiores e adultos.
- Falta de treinamento e alta rotatividade de profissionais nas salas de vacina.
- Horários restritos de funcionamento das salas de vacina, incompatíveis muitas vezes com a jornada de trabalho dos pais/responsáveis.
- Necessidade de registro informatizado das doses individuais das vacinas aplicadas, o que requer infraestrutura e recursos humanos.
- Circulação de notícias falsas nas mídias sociais, aumentando a hesitação vacinal, apontada em 2019 pela OMS como uma das 10 ameaças à saúde global.

O PNI brasileiro, mesmo com orçamento insuficiente, tem quase cinco décadas de existência e é reconhecido mundialmente como um dos programas de vacinação de maior sucesso, um exemplo a ser seguido no mundo. As 29 vacinas gratuitas que compõem o programa estão à disposição da população pediátrica e adulta, e o desafio atual é leva-las às áreas remotas e de difícil acesso do país, com o objetivo de recuperar a elevada cobertura vacinal, voltando aos índices pré-pandemia.

1.2 Justificativa

A queda nas taxas de hospitalizações por DDA associada ao rotavírus vem sendo observada ao longo do tempo, desde a introdução das vacinas orais (mono e pentavalente) sendo mais expressiva nos países com maior cobertura vacinal contra o rotavírus. A vacinação universal em massa contra RV-A, além da redução da mortalidade relacionada à DDA, queda substancial do número de casos de diarreia e das internações hospitalares em muitos países, possui efeito adicional de proteção de rebanho estendido a faixas etárias inelegíveis para receberem a vacina.

Estes resultados também foram observados no Brasil após a introdução da vacina no calendário nacional de imunizações brasileiro em 2006. A taxa de positividade do RV caiu de 22,4% no período anterior à introdução do imunobiológico para 11,6%.

A transmissão comunitária do vírus vacinal G1P[8] já foi demonstrada em crianças e contatos intradomiciliares, com efeito protetor, porém não existem dados na literatura acerca da excreção do vírus vacinal por recém-nascidos e lactentes muito jovens.

A justificativa para a realização do estudo é tentar responder esse hiato de informações sobre a excreção fecal do vírus vacinal G1P[8] em recém-nascidos e lactentes antes da primeira dose da vacina em uma coorte de residentes de Manguinhos, na zona norte do município do Rio de Janeiro. Além da vigilância da excreção do vírus vacinal nesta faixa etária, avaliaremos também se há repercussão clínica associada a este fenômeno.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Identificar a circulação de rotavírus vacinal em uma coorte de recém-nascidos e lactentes até 2 anos de idade, em Manguinhos, Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil socioeconômico dos recém-nascidos e lactentes da coorte.
- Avaliar a dinâmica de excreção e circulação do rotavírus vacinal em recém-nascidos e lactentes em idade pré-vacinal e lactentes vacinados com a primeira (D1) e segunda (D2) doses da vacina monovalente contra RV-A.
- Avaliar se a excreção do vírus vacinal por recém-nascidos e lactentes está associada à expressão clínica nesta faixa etária.
- Determinar a incidência de doença diarreica na coorte de crianças vacinadas com a vacina monovalente.
- Determinar a frequência de eventos adversos pós-vacinais, comparando-as após D1 e D2, e em crianças que excretaram e não excretaram RV-A pós-vacinação.

3 Material e métodos

Este estudo foi construído a partir do acompanhamento da coorte de crianças em Manguinhos, iniciada pelo Laboratório de Doenças Febris Agudas (DFA) do Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em 2012, que possibilitou a realização de outros estudos (112–115). Toda a estrutura logística (profissionais de saúde, agentes de campo, administrativos) necessária para a realização do estudo sobre rotavírus foi proporcionada pelo DFA.

Trata-se de um estudo de coorte, prospectivo, realizado com uma população de recém-nascidos, residentes em Manguinhos, que foi recrutada no momento da realização do teste do pezinho, com o objetivo de serem acompanhados durante dois anos.

O estudo foi conduzido no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (CSEGSF), departamento da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fiocruz e na Clínica da Família Victor Valla (CFVV) da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, ambos situados em Manguinhos, cuja população adscrita na Estratégia de Saúde da Família (ESF) contabiliza aproximadamente 40.000 indivíduos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI sob o número de registro: 31505914.8.0000.5262 em 16/06/2014 (Anexo 1).

3.1 Contextualização do local de estudo e ações de saúde no território:

O bairro de Manguinhos, oficializado em 1981 (116) e delimitado geograficamente em 1988 (117), situa-se na Zona Norte do município do Rio de Janeiro. É composto por treze comunidades, com dados demográficos bastante divergentes, variando de 37.000 (Instituto Pereira Passos) a 53.000 habitantes (cadastro do PSF) (118).

O território de Manguinhos, habitado por uma população marcada pela extrema vulnerabilidade social, econômica, política e ambiental, vítima da violência e intenso tráfico de drogas, possui um dos menores índices de desenvolvimento social (IDS) do município do Rio de Janeiro de acordo com o último censo demográfico realizado no Brasil pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010 (119). No

ranking de 160 bairros do município, Manguinhos situa-se na 154ª posição. Com as mudanças nos questionários e forma de divulgação ocorridas para o Censo 2010, não foi mais possível calcular o índice de desenvolvimento humano (IDH) na escala de bairros, como havia sido feito em 2000. O IDS foi inspirado no IDH calculado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (agência de desenvolvimento global da Organização das Nações Unidas), utilizado em inúmeros países do mundo. Sua finalidade é medir o grau de desenvolvimento social de uma determinada área geográfica em comparação com outras de mesma natureza (119).

Como o próprio nome indica, Manguinhos caracteriza-se por ser uma região de mangue e faz parte da sub-bacia do Canal do Cunha, dentro da grande bacia hidrográfica da Baía de Guanabara. Dois rios dessa bacia cortam o bairro: Jacaré e Faria Timbó. A Estrada de Ferro da Leopoldina passa também pelo bairro, que cresceu desordenadamente sob a forma equivocada de aterramento do terreno com lixo e materiais de várias origens no entorno da Fiocruz, que está localizada há mais de 120 anos no bairro (118).

Nos primeiros anos do século 20 houve uma intensificação do povoamento de uma das áreas de Manguinhos, conhecida como Amorim, onde originalmente existia uma fazenda de propriedade da família de mesmo sobrenome. Nessa localidade, a ocupação ocorreu sob a lógica de povoamento do subúrbio carioca paralelamente ao assentamento de trabalhadores do então Instituto Oswaldo Cruz (atualmente a Fiocruz). Por fim, seguiu-se a lógica de ocupação e uso do solo do que hoje se reconhece como favela (118).

Os projetos habitacionais direcionados para as favelas, ao longo das décadas de 1940 e 1950, apontavam para soluções que propunham retirar do corpo da cidade, em especial das áreas com valorização imobiliária, grupos populacionais considerados marginais à organização social urbana. Manguinhos, nesse contexto, como um espaço pouco valorizado, abrigou projetos de implantação provisória de população e migrantes de várias áreas da cidade e do país (118). Nesta época a localidade conhecida como Parque Carlos Chagas ou Varginha começou a ser povoada, ao mesmo tempo que a Avenida Brasil começou a ser construída com aterramento de alguns manguezais e retificação de parte dos rios que cortam a região (120).

As sublocalidades Parque João Goulart e CHP2 (Conjunto Habitacional Provisório II) começaram a ser ocupadas em caráter provisório, pela necessidade de realocação de pessoas removidas de outras localidades, durante as décadas de 1960 e 1970, com moradias em sua grande maioria de madeira (118). A introdução da alvenaria na construção das habitações em Manguinhos foi difundida a partir do ano de 1983, particularmente durante o mandato do governador Leonel de Moura Brizola (120).

Nos primeiros anos da década de 1990 foram inaugurados, pelo Poder Público Municipal, os conjuntos habitacionais Nelson Mandela (1991) e Samora Machel (1992), cujos ocupantes iniciais eram remanescentes de áreas de risco ou vítimas de tragédias, como o incêndio da “favelinha”, localidade limítrofe entre o Parque João Goulart e Vila Turismo. Outra sublocalidade que surge em 1995, foi Mandela de Pedra, em uma área que englobava os terrenos pertencentes à Companhia Brasileira de Correios e Telégrafos e à Embratel. O conjunto Nelson Mandela ficou conhecido como “Mandela I”, e os demais vizinhos, em virtude da proximidade e por ordem cronológica de ocupação, passaram a ser conhecidos como Mandela II (Samora Machel) e Mandela III (Mandela de Pedra) (120).

As dificuldades econômicas enfrentadas pela população de Manguinhos e o aumento da criminalidade, especialmente crimes de sequestros e roubos de carga, contribuíram para a mudança de algumas empresas da região, cujos terrenos e construções passaram a ser ocupados informalmente pela população (118).

Como um território de grande vulnerabilidade econômica e social, com um dos piores índices de desenvolvimento humano da cidade, Manguinhos foi área prioritária de intervenção do Programa de Aceleração do Crescimento – PAC, lançado em 2007. O projeto uniu os governos federal, estadual e municipal com o objetivo de integração de favelas à cidade formal, através de urbanização e prestação de serviços públicos de qualidade.

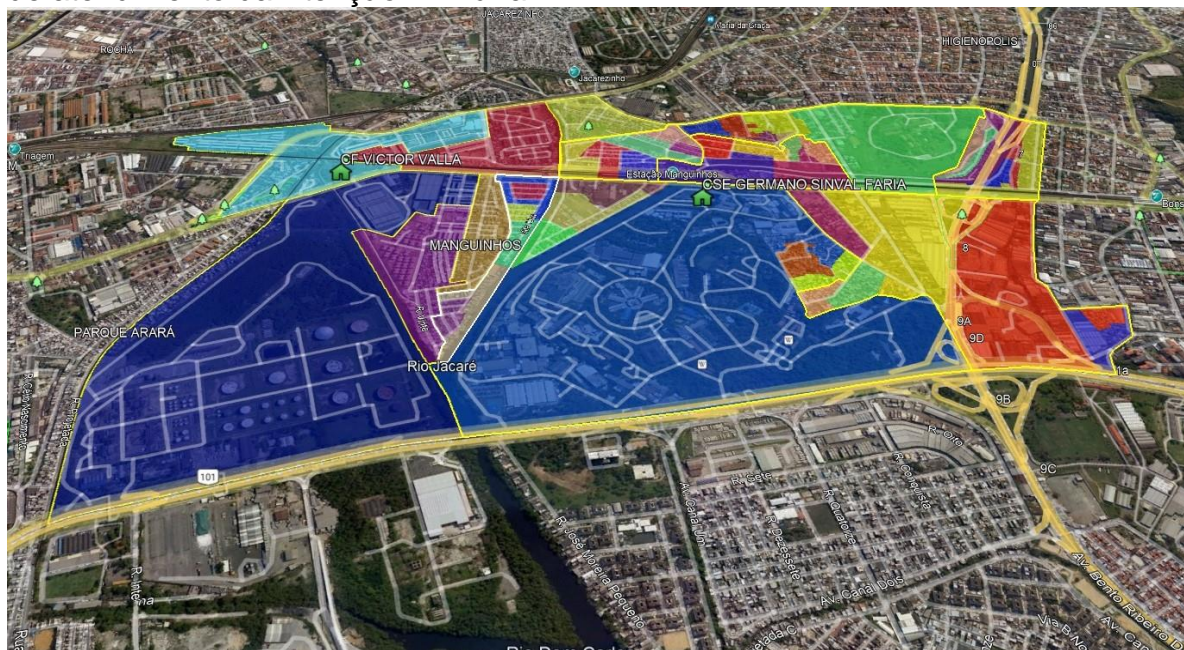
3.2 Serviços de saúde no Complexo de Manguinhos: Teias-Escola Manguinhos

Durante quase cinquenta anos, Manguinhos contou apenas com um único equipamento de saúde para a atenção primária, o CSEGSF, onde atualmente funciona também uma clínica da família (120).

Em 2009, Manguinhos foi beneficiado pela iniciativa entre a Subsecretaria de Atenção Primária, Vigilância de Saúde e Promoção da Saúde da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro e Escola Nacional de Saúde Pública, que assinaram um contrato de gestão da atenção primária à saúde, tornando Manguinhos um Território Escola de Saúde (TEIAS). Em concordância com a Política Nacional de Atenção Básica (PNAB) do Ministério da Saúde, a Saúde da Família em Manguinhos exerce ações primárias de saúde de forma coletiva e individual, atuando na prevenção e promoção da saúde, em diagnóstico de agravos, tratamento e manutenção da saúde da população adscrita (116,120).

Ainda em 2009 com as ações do PAC, o bairro recebeu uma Unidade de Pronto Atendimento (UPA), que originalmente era vinculada à Secretaria de Estado de Saúde (SES/RJ) e posteriormente foi municipalizada. Em abril de 2010, foi inaugurada a CFVV, anexa à UPA. Todos esses equipamentos passaram a ser geridos pelo Teias-Escola Manguinhos (121), ofertando atenção à saúde no território delimitado na Figura 7.

Figura 7 – Vista aérea do território de Manguinhos com suas sublocalidades e locais de atendimento da Atenção Primária.



Fonte: Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro

Em 2010 a ESF foi ampliada e a população estimada na época de 37.000 residentes, foi contemplada com 13 equipes de Saúde da Família, Saúde Bucal, Consultório na rua e Núcleo de Apoio à Saúde da Família, divididas de acordo com as áreas do território e alocadas em dois pontos de atendimento: o CSEGSF, departamento da ENSP, e a CFVV. Esta ampliação possibilitou à população acesso à atenção primária à saúde integral, com valorização da promoção da saúde e atuação das equipes sobre os determinantes sociais da saúde (DSS) (116,120). Além disso, foi constituído o Conselho Gestor Intersetorial de Manguinhos, com a finalidade de fortalecer a gestão participativa sobre a política de saúde entre os moradores. Nesse processo, diversos participantes, gestores e profissionais da saúde, sociedade civil, instâncias e órgãos governamentais de diferentes setores têm sido capacitados para entenderem e atuarem nos DSS que afetam a qualidade de vida dos moradores de Manguinhos (120,121).

Como característica de um território escola, especialmente sob a gestão da Fiocruz, a pesquisa e o ensino fazem parte da missão institucional, possibilitando a produção de conhecimentos acerca de práticas e de políticas públicas voltadas para a saúde. Esperava-se que essa iniciativa produzisse mudanças concretas na reorganização do modelo de atenção à saúde e melhorias efetivas na condição de

saúde e qualidade de vida da comunidade de Manguinhos. Foi uma forma da Fiocruz investir na aplicação do conhecimento científico produzido sobre a realidade, a comunidade que se encontra geograficamente no seu entorno (Figura 8) e consequentemente, a sociedade civil (120). No início de 2013 foi implantada uma Unidade de Polícia Pacificadora (UPP) em Manguinhos (120).

Figura 8. Vista aérea da Fundação Oswaldo Cruz, Campus Manguinhos.



Fonte: Fiocruz imagens, acesso em 07/07/2022, <https://www.fiocruzimagens.fiocruz.br/media.details.php?mediaID=725>.

3.3 Período do estudo:

Novembro de 2014 a setembro de 2019. Entretanto, em virtude da violência no território a partir de 2016, o estudo ficou restrito ao CSEGSF.

3.4 Critério de elegibilidade para participação no estudo:

Recém-nascidos cadastrados pelo Programa de Saúde da Família de Manguinhos.

3.5 Critérios de inclusão:

Recém-nascido, morador de Manguinhos, cujos pais ou responsáveis tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Apêndice 1). Os

recém-nascidos foram recrutados no momento de realização do teste do pezinho com aproximadamente 5-7 dias de vida, quando eram preenchidos os formulários com dados referentes ao parto do participante e dados sociodemográficos (Apêndices 2 e 3).

3.6 Critérios de exclusão:

Foram excluídas as crianças cujos pais retiraram o TCLE, mudaram de endereço ou não forneceram nenhuma amostra de fezes para realização dos exames. Estes últimos continuavam sendo atendidos pela equipe médica sempre que solicitado pelos pais/responsáveis.

3.7 Seguimento:

Os recém-nascidos e lactentes da coorte foram acompanhados nas consultas de rotina do projeto e durante os episódios de DDA até completarem dois anos de idade.

As coletas programadas de fezes foram realizadas quinzenalmente entre 15 e 45 dias de vida (três amostras), após as duas doses da Rotarix® (duas amostras) e em casos de DDA.

No Quadro 1, consta o calendário de visitas e coletas de fezes dos participantes do estudo.

Quadro 1. Calendário de visitas do estudo

Visita do estudo	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visita 6	Visita 7	Visita 8	Visita 9	Visita 10	Visita livre demanda
Data da visita	0-7 dias de vida	15 dias de vida	30 dias de vida	45 dias de vida	2 meses	4 meses	8 meses	12 meses	18 meses	24 meses	Queixa de DDA
Consentimento informado	X										
História gestacional, do parto e dados sociodemográficos	X										
Exame físico			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Amostra de fezes para pesquisa de RV-A (PCR)		X	X	X	X	X					X
Verificação da D1 Rotarix®					X						X
Verificação da D2 Rotarix®						X					X
Verificação cartão vacinal (DTP/Hib/Hep B), VIP, PCV 10, meningocócica C, VOP, SCR, SCRv, Hep A, Influenza, Febre amarela).			X	X	X	X	X	X	X	X	X

As coletas de fezes eram realizadas, preferencialmente, durante as consultas pediátricas quando o participante evacuava na fralda. Caso contrário, eram entregues potes plásticos para os pais/responsáveis realizarem as coletas no domicílio; estas amostras eram entregues posteriormente ao agente de campo ou trazidas aos ambulatórios pelos pais/responsáveis tão logo fossem coletadas. A primeira amostra de fezes, com 15 dias de vida, era recolhida pelo agente de campo no domicílio do participante. A orientação para coleta das amostras de fezes após administração das duas doses da vacina Rotarix® (D1 e D2) era que fosse efetuada com aproximadamente 7 dias após a aplicação do imunobiológico.

As consultas de rotina eram realizadas de forma programada aos 30 e 45 dias de vida, aos dois, quatro, oito, doze, dezoito e vinte e quatro meses de idade, para acompanhamento do crescimento e desenvolvimento do participante, conforme demonstrado na Tabela 1. Os pais/responsáveis eram orientados a procurar a equipe de pesquisa sempre que necessário, para consultas extras.

A vigilância ativa e passiva de DDA era realizada pela equipe de pesquisa, que contatava os pais/responsáveis periodicamente através de ligações telefônicas, e os participantes do estudo também eram orientados a entrar em contato através de telefonema/Whatsapp para informar sobre episódios de DDA.

Em todas as consultas era preenchido o formulário individual de atendimento do participante (Apêndice 4), com dados relevantes do exame físico, incluindo peso, estatura, perímetro cefálico, além de perguntas específicas sobre episódio de doença diarreica aguda, quando esta estava presente.

Em situações em que havia dificuldade de comparecimento ao CSEGSF ou CFVV, era oferecido o carro da equipe de pesquisa para buscar o participante e seu familiar na comunidade, para trazê-los à consulta.

3.8 Tamanho da amostra:

O cálculo amostral do estudo foi determinado estimando-se o tamanho mínimo da amostra para testar se a taxa de excreção de RV-A após a vacinação na população do estudo é semelhante a uma taxa hipotética.

Utilizou-se 20% como estimativa inicial da taxa de excreção pós-vacinação com base na taxa de detecção de RV-A em amostras de fezes de crianças em um estudo anterior (122). Com base nessa suposição inicial, foi usada uma fórmula existente (123) para estimar o tamanho mínimo necessário da amostra a fim de testar se a taxa real de excreção na população do estudo estava dentro de 5% da taxa hipotética de 20%. Ao calcular o tamanho da amostra, exigiu-se poder de 80%, nível de significância de 5% e perda de seguimento de 10%. O cálculo utilizou as seguintes variáveis:

Variável	Definição
λ_0	Suposição inicial quanto à taxa de excreção após a vacinação com Rotarix®
λ_a	Suposição inicial +/- margem de erro de 5%
α	Nível de significância
$1 - \beta$	Poder do teste
$z_{1-\alpha}$	Valor crítico correspondente a $(1 - \alpha)$
$z_{1-\beta}$	Valor crítico correspondente a β

Utilizando estas variáveis, o tamanho amostral mínimo n foi definido como:

$$n = \frac{(z_{1-\alpha}\lambda_0 + z_{1-\beta}\lambda_a)^2}{(\lambda_0 - \lambda_a)^2}$$

Após o arredondamento, o tamanho final da amostra foi de 118 indivíduos a serem incluídos.

3.9 Análise estatística:

Foi calculada a frequência dos participantes em cada momento em que apresentaram um teste positivo para RV-A nas fezes. Foi realizada também a análise de sobrevivência de Kaplan-Mayer para estimar a probabilidade de excreção do genótipo vacinal (G1P[8]) em função do número de dias desde a data da vacinação. Todos os testes foram bicaudais, com nível de significância de 0,05 e realizados com PRISM v. 9.2 (Graphpad Software, San Diego, CA).

3.10 Coleta, transporte e conservação de amostras fecais:

Coletores fecais plásticos sem conservantes foram utilizados para a coleta das amostras de fezes. As amostras foram retiradas com espátulas de madeira

diretamente das fraldas descartáveis utilizadas pelas crianças após evacuação espontânea, no domicílio ou durante as consultas. No caso de recém-nascidos, a equipe de assistência buscou, preferencialmente, as fezes no domicílio do paciente.

As amostras foram conservadas à temperatura de 4°C em refrigerador específico para amostras de material biológico e encaminhadas ao Laboratório Regional de Referência para Rotavírus (LRRR)/Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz.

3.11 Ensaios laboratoriais:

Os ensaios específicos realizados nas amostras fecais seguiram protocolos estabelecidos pelo RRRL-LVCA e foram descritos na íntegra por Cantelli e cols. em 2020 (39). Os testes realizados foram:

a) Detecção de RV-A através da transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase qualitativa e quantitativa (RT-PCR e RT-qPCR):

Para a extração de RNA das amostras fecais e detecção do RV-A, o laboratório utilizou os seguintes *kits*, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante: QIAcube® Automated System e QIAamp® Viral RNA Mini *kit* (Qiagen, CA, EUA); Sistema Applied Biosystems® 7500 de PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O resultado do RT-qPCR foi considerado positivo se o valor de limiar do ciclo (Ct) fosse $\leq 40,00$.

b) Genotipagem dos RV-A através de Multiplex Nested PCR:

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa multiplex semi-nested (RT-PCR) foi realizada para genotipagem de G e P usando o sistema SuperScript® III One-Step RT-PCR com Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e os primers 9con1L/VP7deg (VP7) e 4con3/4con2 (VP8*) para gerar fragmentos de 904 pares de bases (pb) e 876 pb, respectivamente.

c) Caracterização molecular do gene VP8 do RV-A:

Os produtos da RT-PCR foram purificados usando o gel Wizard® SV e o *kit* PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os amplicons purificados do gene VP8* do RV-A foram analisados por sequenciamento de Sanger usando os *kits* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing *Kit* e o ABI Prism 3730 ou 3500 Genetic Analyser® (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os cromatogramas foram analisados e as sequências nt (consenso) foram editadas usando o BioEdit 7.2.1 Sequence Alignment Editor e a similaridade nt foi avaliada com a utilização da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os genótipos do RV-A foram atribuídos com o auxílio da ferramenta de genotipagem automatizada RotaC2.0 para rotavírus do Grupo A (<https://rotac.regatools.be/>). As sequências genéticas representativas de VP8* RV-A obtidas foram submetidas ao GenBank sob os números de acesso MN366044-MN366074. O pirossequenciamento para análise de mutação do vírus vacinal G1P[8] excretado nas fezes foi realizado usando PyroMark Q96 ID (QIAGEN Valencia, CA, EUA).

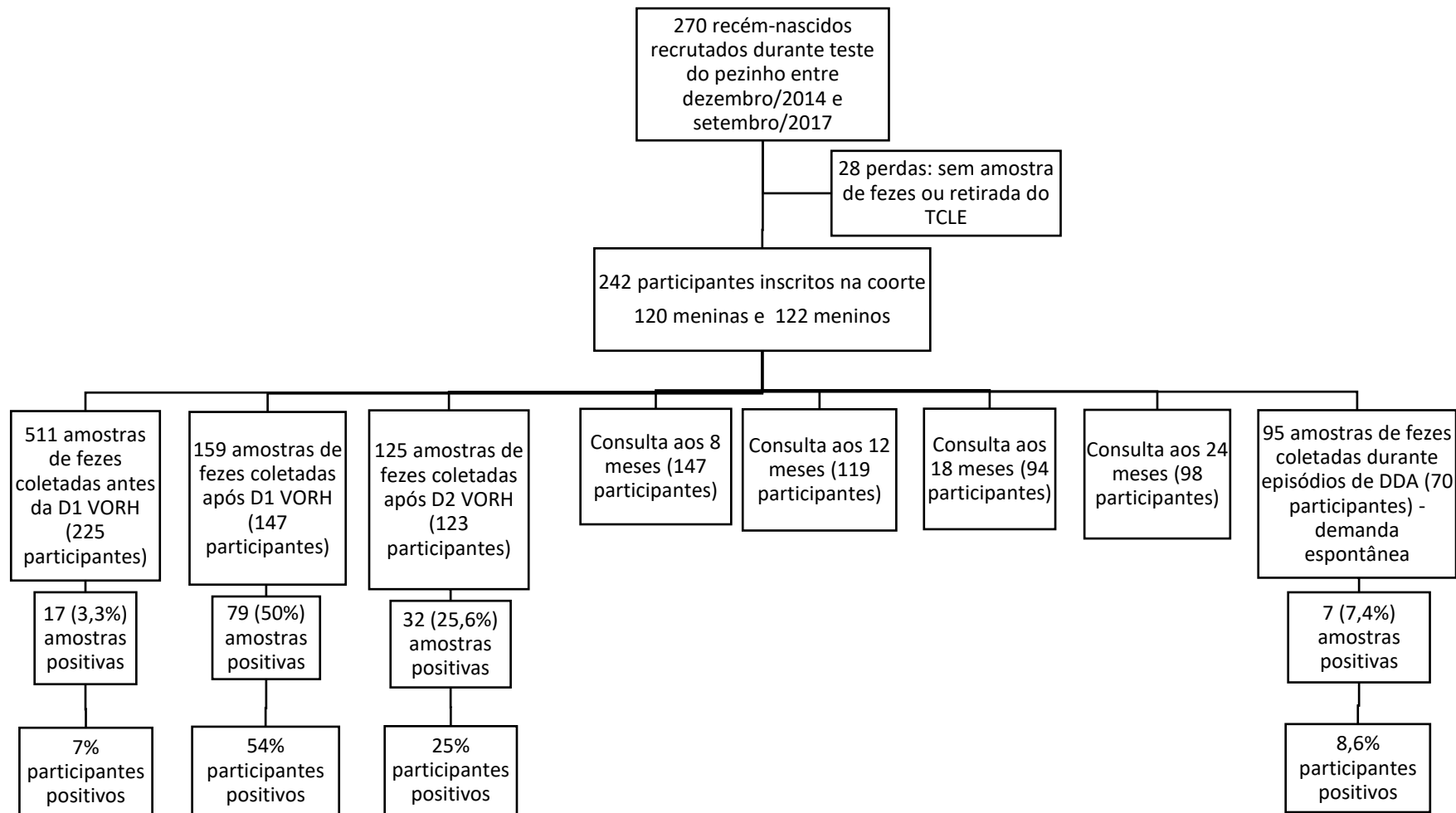
4 Resultados

De dezembro de 2014 a setembro de 2017 foram recrutados 270 recém-nascidos, sendo que 28 pais/responsáveis retiraram o consentimento, mudaram-se da área ou não forneceram nenhuma amostra de fezes. O tempo médio de acompanhamento dos participantes foi de 23 meses, variando de 1 a 42 meses.

Durante todo o período do estudo foram coletadas 890 amostras de fezes, sendo 795 (89,3%) provenientes de coletas pré e pós-vacinais e 95 (10,7%) de episódios de DDA. O RV-A foi identificado em 135 amostras de fezes através de RT-PCR, o que significa uma taxa global de positividade de 15,2% entre os recém-nascidos e lactentes acompanhados até dois anos de idade.

A distribuição dos participantes em relação ao gênero foi homogênea, 122 eram do sexo masculino e 120 do sexo feminino. No estudo havia 3 pares de gemelares. Não foram identificadas comorbidades entre os participantes da coorte. Dos 242 participantes, 174 (72%) foram recrutados no CSEGSF e 68 (28%) na CFVV. A Figura 9 representa o fluxograma para recrutamento e acompanhamento dos participantes da coorte.

Figura 9 - Fluxograma para recrutamento e acompanhamento dos participantes



Com relação aos dados sociodemográficos, estes foram obtidos de 223 participantes através de um questionário autorreferido, e são mostrados na Tabela 1. Não houve diferença entre o número de participantes do sexo feminino e masculino. É possível observar que quase 60% das famílias vivem com apenas um salário mínimo por mês. Aproximadamente 30% das mães dos participantes possuíam ensino fundamental incompleto e ensino médio completo. Os tipos de moradia eram, majoritariamente, constituídos de casas de tijolos. Em relação ao abastecimento de água e esgotamento sanitário, a quase totalidade dos participantes afirmou possuir saneamento básico.

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos participantes

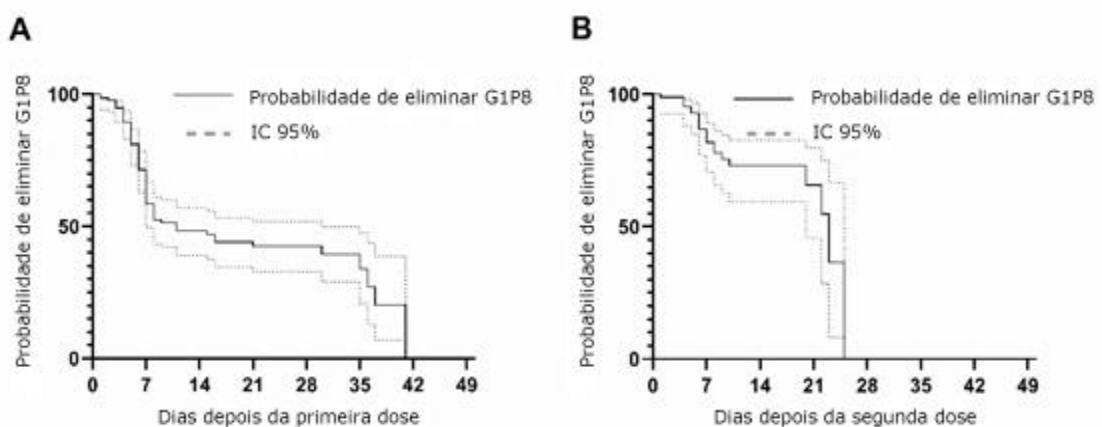
<u>Variável</u>	N	%
1) Gênero dos participantes		
Feminino	120/242	49,6
Masculino	122/242	50,4
2) Renda mensal familiar		
Até 1 salário mínimo	128/223	57,4
Entre 1-2 salários mínimos	70/223	31,4
Entre 2-3 salários mínimos	18/223	8,1
Entre 3-4 salários mínimos	5/223	2,2
Acima de 5 salários mínimos	2/223	0,9
3) Grau de escolaridade materna		
Ensino fundamental incompleto	62/223	27,8
Ensino fundamental completo	26/223	11,6
Ensino médio incompleto	47/223	21,1
Ensino médio completo	66/223	29,6
Nível superior incompleto	19/223	8,5
Nível superior completo	3/223	1,3
4) Tipo de moradia		
Casa de tijolo	183/223	82,1
Apartamento	39/223	17,5
Barraco de madeira	1/223	0,4
5) Abastecimento de água		
Sim	217/223	97,3
Não	6/223	2,7
6) Esgotamento sanitário		
Sim	220/223	98,7
Não	3/223	1,3

Observação: Itens 2 a 6 com 19 dados faltantes.

Foi possível identificar, entre os recém-nascidos e lactentes jovens (16 participantes com idades entre 3-46 dias de vida) a eliminação do RV-A nas fezes antes de receberem a primeira dose de Rotarix®. Através de sequenciamento genético, o genótipo vacinal G1P[8] foi confirmado em 37,5% (6/17) destas amostras. Um dos participantes eliminou RV-A aos 16 e aos 46 dias de vida, sendo que na primeira amostra, apesar do RT-PCR ter identificado o RV-A como G1P[8], a análise pelo sequenciamento não foi possível devido à má qualidade e/ou carga viral baixa da amostra de fezes. Estes 16 participantes eram totalmente assintomáticos no momento da detecção do rotavírus; a maioria (75%) encontrava-se em aleitamento materno exclusivo, e nenhum deles apresentou, ao longo dos dois anos de acompanhamento, episódios de DDA. Nove destes 16 participantes também eliminaram G1P[8] vacinal após a primeira dose de Rotarix®, e um deles excretou o vírus vacinal após as duas doses da vacina.

O tempo médio de excreção do RV-A nas fezes após a 1ª dose da vacina foi de 8,8 dias (variação de 1 a 41 dias) e mediana de 6 dias. Em relação à 2ª dose, o tempo médio de excreção foi de 8,2 dias (variação de 0 a 27 dias) e mediana de 6 dias. A probabilidade de excreção fecal do genótipo vacinal pelos lactentes da coorte em dias decorridos após as doses da Rotarix® é mostrada na Figura 10.

Figura 10. Probabilidade de eliminação de G1P[8] vacinal em dias após D1 (A) e após D2 (B) da Rotarix®.



Legenda: Análise de sobrevivência de Kaplan-Mayer

As taxas de positividade da detecção do RV-A nas amostras de fezes da coorte em cada uma das coletas programadas e seus respectivos genótipos são mostrados detalhadamente na Tabela 2.

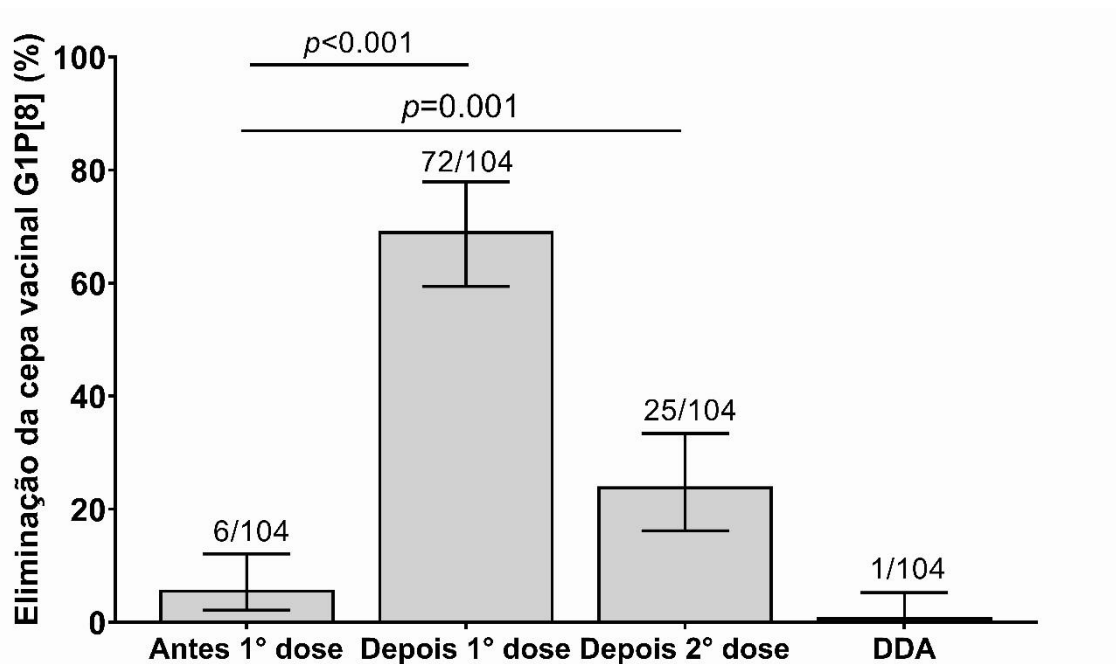
Tabela 2. Taxas de positividade de RV-A e genótipos identificados

Momento da coleta das fezes	Taxa de positividade das amostras	Genótipos identificados
Pré-vacinal	3,3% (17/511)	6 amostras G1P[8] - vacinais 8 amostras G1P[8] – não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra 3 amostras G e P não-tipáveis
Após D1 Rotarix®	49,7% (79/159)	
Entre 0-7 dias	68% (54/79)	53 amostras G1P[8] - vacinais 1 amostra G1P[8] – não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra
Entre 8-14 dias	20% (16/79)	11 amostras G1P[8] – vacinais 3 amostras G1P[8] - não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra 1 amostra G3P[9] 1 amostra G e P não-tipável
Após 14 dias	11% (9/79)	8 amostras G1P[8] – vacinais 1 amostra G e P não-tipável
Após D2 Rotarix®	25,6% (32/125)	
Entre 0-7 dias	62,5% (20/32)	17 amostras G1P[8] - vacinais 2 amostras G1P[8] – não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra 1 amostra G12P[8]
Entre 8-14 dias	19% (6/32)	4 amostras G1P[8] – vacinais 1 amostra G1P[8] – não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra 1 amostra G não-tipável P[8]

Momento da coleta das fezes	Taxa de positividade das amostras	Genótipos identificados
Após 14 dias	19% (6/32)	4 amostras G1P[8] – vacinais 2 amostras G1P[8] – não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra
Após episódio de DDA	7,4% (7/95)	1 amostra G1P[8] – vacinal 3 amostras G não-tipável e P[8] 1 amostra G12P[8] 1 amostra G3P[8] 1 amostra G e P não-tipável
Total	15,2% (135/890)	104 amostras G1P[8] – vacinais 17 amostras G1P[8] - não foi possível o sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra 6 amostras G e P não-tipáveis 1 amostra G3P[9] 2 amostras G12P[8] 1 amostra G3P[8] 4 amostras G não-tipável P[8]

Das 135 amostras de fezes com detecção do RV-A pelo RT-PCR, 104 (77%) foram identificadas como sendo genótipos vacinais (G1P[8] RV1) através da caracterização molecular de VP8*. A Figura 11 mostra a porcentagem de excreção do vírus vacinal G1P[8] nos diferentes momentos de testagem, sendo particularmente mais frequente após a primeira dose da vacina Rotarix®.

Figura 11. Eliminação fecal de G1P[8] vacinal nos diferentes momentos da coorte.



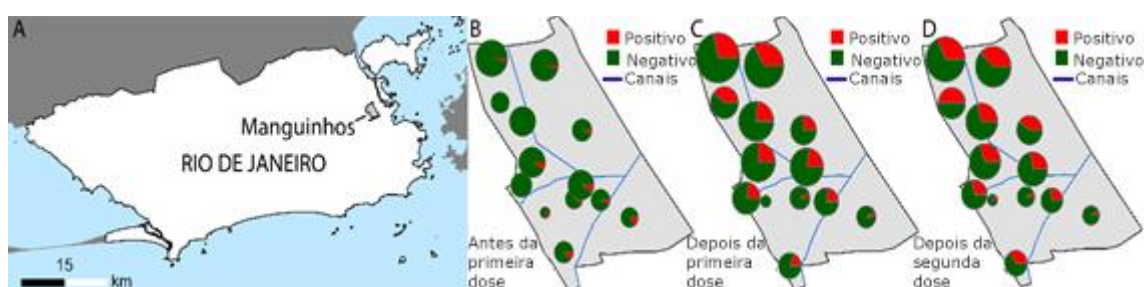
Foi possível identificar 29 participantes que excretaram RV em mais de um momento ao longo do acompanhamento da coorte; 55% destes (16 participantes) excretaram RV tanto após D1 quanto após D2.

O número de participantes que apresentaram diarreia após a vacinação e excretaram RV-A foi semelhante nas duas doses da vacina. Trinta lactentes tiveram diarreia após D1 com detecção de RV-A nas fezes em 15 deles (50%). A maioria das amostras (n=14) foi identificada com sendo G1P[8] e uma amostra, como G3P[9]. Entre as amostras G1P[8], duas não puderam ser analisadas por sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra, e 12 amostras foram identificadas por meio da caracterização molecular de VP8* como sendo o genótipo vacinal. Em relação à D2, 26 lactentes apresentaram diarreia. Destes, apenas quatro (15,4%) eliminaram RV-A nas fezes, sendo 3 amostras G1P[8] e uma G12P[8]. Dentre as amostras identificadas como G1P[8], uma não pôde ser analisada por sequenciamento devido à baixa carga viral ou má qualidade da amostra, e as outras duas amostras foram identificadas como sendo o genótipo vacinal através da caracterização molecular de VP8*.

A análise da distribuição espacial dos domicílios antes e depois das duas doses da vacina revelou que a disseminação do vírus vacinal era rara antes da

vacinação e aumentou consideravelmente após as duas doses de Rotarix[®], de acordo com a Figura 12.

Figura 12. Localização de Manguinhos na cidade do Rio de Janeiro (A) e distribuição espacial dos domicílios dos participantes que excretaram a cepa vacinal antes (B) e após a vacinação contra rotavírus (C e D). Positivo e negativo indicam os resultados do teste de PCR para rotavírus em cada momento do estudo. Os gráficos de pizza representam a proporção de crianças positivas e negativas nas sublocalidades dentro da área de estudo.



Legenda: Elaborado por Trevon Fueller

De todos os episódios relatados de DDA não associada à vacinação, nenhum resultou em hospitalização. Todos os participantes foram tratados sem necessidade de reidratação parenteral e/ou observação clínica na unidade, sendo prescrito o uso de sais de reidratação oral no domicílio. Através do RT-PCR, o RV-A foi detectado em 7 das 95 amostras. A detecção do genótipo vacinal G1P[8] através da análise do sequenciamento de VP8* ocorreu em apenas uma amostra, com uma taxa de prevalência de 7,4%. A idade média destes seis participantes era de 9,4 meses, variando de 6 a 22 meses, sendo todos eles completamente imunizados para rotavírus. O número médio de evacuações em 24 horas foi de três. Estes episódios foram associados à febre em quatro casos, a vômitos em dois casos e a sintomas respiratórios em cinco casos. O lactente com DDA que teve detecção do genótipo vacinal tinha 6 meses de idade, e na mesma amostra houve codetecção de norovírus através do RT-PCR qualitativo. Adicionalmente, os genótipos G3P[8] e G12P[8] foram detectados em lactentes de 6 e 10 meses com gastroenterite aguda, respectivamente. As demais amostras com detecção de RV-A foram identificadas como: G-não tipável P[8] em 3 lactentes de 6 e 8 meses; e G e P-

não tipáveis em um lactente de 22 meses de idade. Houve detecção simultânea de norovírus em 3 destas amostras. Estes dados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados dos participantes com DDA causada por RV-A.

Nº participante	Idade (meses)	Nº evacuações/24h	Outros sintomas	Codeteccção norovírus	Genótipo identificado
63	22	3	febre e sintomas respiratórios	sim	G?P?
219	10	4	febre e sintomas respiratórios	não	G12P[8]
231	8	3	febre e sintomas respiratórios	não	G?P[8]
234	8	4	vômitos, febre e sintomas respiratórios	não	G?P[8]
253	6	3	vômitos e sintomas respiratórios	não	G?P[8]
265	6	1	sintomas respiratórios	sim	G1P[8] vacinal
265	6	3	sintomas respiratórios	sim	G3P[8]

A comparação entre o grupo que eliminou RV-A após a vacinação e o grupo que não eliminou, com relação à presença de DDA não associada à vacinação ao longo do estudo, está representada na Tabela 4, que mostra também os agentes detectados nas amostras de fezes de cada grupo. O norovírus foi detectado mais frequentemente tanto entre os lactentes que excretaram quanto nos que não excretaram RV-A após a vacinação.

Tabela 4. Resultados das análises das amostras de fezes de DDA dos grupos com e sem excreção de RV-A após a vacinação.

	Grupo que excretou rotavírus após vacina	Grupo que não excretou rotavírus após vacina
Norovírus	13/51 (25,5%)	15/44 (34,1%)
Rotavírus	4/51 (7,8%)	0/44 (0%)
Codeteccção rotavírus e norovírus	0/51 (0%)	3/44 (6,8%)
Negativo	34/51 (66,7%)	26/44 (59,1%)

É importante ressaltar que nenhum participante apresentou fezes com sangue após as doses de Rotarix® ou sintomas que sugerissem intussuscepção. Eventos supostamente atribuíveis à vacinação (anteriormente chamados de eventos adversos pós-vacinais) relatados pelos pais ou responsáveis após D1 e D2 da Rotarix® são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Eventos supostamente atribuíveis à vacinação contra rotavírus.

	1ª dose		2ª dose	
	N	%	N	%
Febre	77	38% (77/202)	63	31% (63/202)
Sintomas respiratórios (tosse, coriza)	65	32% (65/202)	26	13% (26/202)
Diarreia	30	14,8% (30/202)	26	13% (26/202)
Vômitos	10	5% (10/202)	10	5% (10/202)
Recusa alimentar	5	2,5% (5/202)	2	1% (2/202)

Ao analisar os eventos supostamente atribuíveis à vacinação somente entre os participantes que excretaram RV-A após as doses de Rotarix®, observa-se aumento da frequência de sintomas respiratórios após a segunda dose (Tabela 6).

Tabela 6. Eventos supostamente atribuíveis à vacinação em participantes que excretaram RV-A após D1 e D2.

	1ª dose		2ª dose	
	N	%	N	%
Febre	31	39,2% (31/79)	15	48,4% (15/31)
Sintomas respiratórios (tosse, coriza)	29	36,7% (29/79)	15	48,4% (15/31)
Diarreia	14	17,7% (14/79)	4	12,9% (4/31)
Vômitos	2	2,5% (2/79)	2	6,5% (2/31)
Recusa alimentar	1	1,3% (1/79)	1	3,2% (1/31)

5 Discussão

O estudo foi capaz de demonstrar, por meio do desenho longitudinal e através de amplificação de material genético das amostras fecais, a circulação comunitária da cepa G1P[8] derivada da vacina Rotarix® entre recém-nascidos e lactentes, antes da primeira dose da vacina, durante o ciclo de imunização, e em episódios de DDA.

Observou-se que quase 60% das famílias participantes do estudo viviam com apenas um salário mínimo/mês e cerca de 30% das mães não possuíam o ensino fundamental completo. Quando perguntadas sobre a atividade laboral, 114 (51,1%) mães informaram ser do lar. A maior parte dos participantes residia em casa de tijolo e informou possuir abastecimento de água e esgotamento sanitário. Apesar desta informação fornecer a impressão de que as condições de moradia são satisfatórias, muitas construções em Manguinhos são habitações irregulares, mal ventiladas, em terrenos invadidos e com conexões clandestinas de água e de esgoto, sem garantia de potabilidade da água para consumo humano (124).

O RV-A foi detectado em 135 das 890 amostras de fezes coletadas dos participantes da coorte, sendo que 17 delas eram provenientes de recém-nascidos e lactentes entre 15 e 60 dias de vida.

A eliminação da cepa vacinal por recém-nascidos e lactentes jovens assintomáticos e ainda não imunizados reforça a segurança do uso da vacina monovalente humana Rotarix® em ambientes densamente povoados. Estes achados poderiam ser extrapolados para ambientes onde há proximidade de contato como unidades de terapia intensiva (125). Pode-se especular que a administração da vacina a bebês prematuros internados, quando atingissem a idade cronológica adequada, seria bem tolerada e segura do ponto de vista da ausência de complicações devido à pequena possibilidade de transmissão nosocomial do vírus vacinal (126). Atualmente em todo o mundo existem diferentes orientações sobre vacinação de bebês internados em unidades de terapia intensiva (UTI) neonatais, quando a idade cronológica para receber o imunizante é atingida. Muitos países, inclusive o Brasil, não recomendam o uso

da vacina contra RV para lactentes hospitalizados, pelo receio da disseminação da cepa vacinal para outros pacientes internados no mesmo ambiente (99).

A transmissão do vírus vacinal a partir de lactentes vacinados para populações não imunizadas e/ou não elegíveis para receber o imunizante foi demonstrada em diversos trabalhos (96,127–129), porém a excreção de G1P[8] vacinal por recém-nascidos e lactentes com menos de dois meses de idade, totalmente assintomáticos, ainda não havia sido demonstrada. Estudos de base hospitalar no hemisfério Norte relataram até 26% de imunidade de rebanho para crianças não vacinadas (130), entretanto essa proteção indireta não parece ser tão expressiva nos países de baixa renda (131). Em uma região econômica e socialmente carente como Manguinhos, no entanto, os efeitos indiretos da imunidade de rebanho, proporcionados por um programa de vacinação universal em massa (132) mostram-se benéficos. Sessenta e três por cento dos bebês que excretaram RV-A nas fezes antes das duas doses da vacina também apresentaram excreção após a D1, D2 ou ambas as doses de Rotarix®. Na literatura, há evidências de que dois episódios de infecção, sintomáticos ou não, poderiam ter efeito protetor contra doença diarreica moderada a grave (55). É importante ressaltar que nenhum dos 16 participantes que excretaram G1P[8] antes da D1 de Rotarix® apresentou DDA ao longo do acompanhamento de dois anos e 75% deles encontravam-se em aleitamento materno exclusivo. Há vasta literatura científica demonstrando os benefícios do aleitamento materno exclusivo desde o nascimento em relação à proteção contra infecções bacterianas e virais, e redução do risco de morte por gastroenterites e infecções respiratórias (133–135).

A infecção pelo RV no período neonatal difere clínica e epidemiologicamente da infecção nos lactentes maiores por apresentar-se de forma oligo ou assintomática (68,136); geralmente é causada por genótipos menos virulentos e a imunidade conferida é transferida de maneira passiva pelas mães (137). Eventualmente a gastroenterite pelo RV em recém-nascidos a termo ou prematuros pode ser grave e resultar em hospitalização, com complicações como enterocolite necrosante e perfuração intestinal (68). Com o objetivo de ampliar a cobertura vacinal contra o RV desde o nascimento, especialmente em países de baixa e média renda, onde a carga da doença é elevada no primeiro

ano de vida (138), esforços contínuos têm sido empregados para o desenvolvimento de uma vacina neonatal contra o RV (139,140). Um benefício adicional, além da proteção precoce contra gastroenterite grave pelo RV, seria a segurança em relação ao risco de intussuscepção, evento raro entre recém-nascidos (139,140). Como ainda não há disponibilidade de uma vacina neonatal, a recomendação vigente da OMS é para que os países iniciem a vacinação a partir de 6 semanas de vida, a fim de garantir a indução da proteção antes da exposição ao RV (23).

A detecção do genótipo vacinal deveu-se, principalmente, às amostras pós-vacinais. Mais de 60% dos bebês da coorte eliminou G1P[8] vacinal na primeira semana após a primeira e segunda doses da Rotarix®. Este dado é compatível com achados de ensaios clínicos randomizados, nos quais o vírus derivado da vacina foi eliminado nas fezes após ambas as doses, com maior taxa de detecção de G1P[8] após a primeira quando comparada com a segunda dose (127,129,141–144). O tempo médio de excreção do vírus nas fezes, após a vacinação, é de 10 dias, com pico máximo de excreção no sétimo dia (127,145).

A distribuição espacial das amostras de fezes com detecção de RV evidencia maior concentração nas sublocalidades mais próximas à Fiocruz. Foi possível observar ao longo do estudo que moradores destas sublocalidades aderiram mais à pesquisa e procuraram a equipe com maior frequência do que os moradores de áreas mais afastadas do CSEGSF, o que se refletiu no número de amostras fecais.

Não foi observada circulação expressiva de genótipos diferentes do vacinal, exceto em 4 amostras de fezes. Duas destas amostras foram identificadas após o sequenciamento como G3P[9] e G12P[8]. Ambas foram coletadas após D1 e D2 respectivamente, e os participantes apresentaram diarreia pós-vacinal sem gravidade.

Apesar de ser uma amostra muito pequena e não representativa da população de Manguinhos, é possível observar que tanto o grupo que excretou quanto o que não excretou G1P[8] após a vacina apresentou DDA com detecção de RV isoladamente ou codetecção de RV e norovírus nas amostras de fezes.

Não foram observados surtos de infecções causadas por RV-A nesta coorte. Todos os sete episódios de DDA atribuídos ao RV-A foram leves, tratados

ambulatorialmente com o uso de sais de reidratação oral, e ocorreram em crianças totalmente imunizadas. Houve apenas um caso de gastroenterite aguda em que o genótipo G1P[8] vacinal foi detectado 56 dias após a segunda dose da vacina. Nesta amostra de fezes, houve codetecção do norovírus, dificultando a identificação da verdadeira causa da DDA. Com a redução drástica da circulação do RV, o norovírus tornou-se uma das causas mais frequentes de gastroenterite (146,147). Não surpreendentemente, no estudo em Manguinhos o norovírus foi mais comum do que o rotavírus como agente causador da DDA. Uma elevada diversidade de genótipos de norovírus circulou entre os participantes do nosso estudo, conforme descrito anteriormente (148).

De acordo com a literatura, a introdução de vacinas contra RV reduziu substancialmente a carga da doença diarreica associada ao vírus selvagem (142–144,149–151). Da mesma forma, demonstrou-se nesta coorte que não ocorreram casos graves de DDA associada à infecção pelo RV selvagem, todos residentes em uma comunidade vulnerável e com alta cobertura vacinal, nos primeiros 24 meses de vida. A incidência de DDA nesta população foi ainda menor do que a relatada em países de baixa e média renda (152). Os resultados desta coorte podem servir de exemplo bem-sucedido da implementação da vacinação universal em massa contra o RV, tanto em termos de segurança do imunobiológico quanto de redução da mortalidade e da carga de doença, que se traduzem em menor utilização de recursos públicos destinados ao atendimento e tratamento de doenças diarreicas (142–144,149,150). Os ganhos objetivos diretos para a população vacinada e os indiretos, como a proteção de rebanho para populações não contempladas pela vacinação (menores de 42 dias de vida e adultos) são diretamente proporcionais à cobertura vacinal elevada (143,153,154).

Não foi observado nenhum evento adverso grave pós-vacinal como anafilaxia, intussuscepção ou sangue nas fezes após duas doses de Rotarix®. Embora alguns participantes do estudo tenham apresentado febre após a vacinação, isto se deveu à administração concomitantemente de outras vacinas, dentre elas a pentavalente (DTP/*Haemophilus influenzae* tipo b/Hepatite B), a antipneumocócica e poliomielite inativada.

Este estudo teve pontos fortes e fracos. Entre os pontos fortes, é possível destacar o desenho longitudinal em que uma coorte de crianças foi acompanhada desde o nascimento até dois anos de idade em uma comunidade vulnerável. Outro ponto forte foi a identificação do RV-A através de genotipagem e outros métodos moleculares usando alvos específicos para confirmação do vírus vacinal (G1P[8]). As limitações incluíram a perda de acompanhamento inerente a estudos longitudinais (112), o que resultou em menor número de consultas médicas e de amostras de fezes analisadas. Essa perda de acompanhamento foi atribuída, em parte, à vulnerabilidade social e econômica dos participantes do estudo que vivenciaram rotineiramente a violência urbana, tornando difícil para alguns deles comparecerem às visitas de estudo. Outra limitação do estudo foi que nem todas as cepas de RV puderam ser genotipadas ou sequenciadas devido à baixa carga viral ou à má qualidade da amostra de fezes. Esta limitação pode ter subestimado a estimativa da frequência do genótipo vacinal G1P[8]. Por fim, não foi possível obter dados sobre a administração da Rotarix® em lactentes de famílias próximas às dos participantes menores de dois meses, no momento em que foi detectada a excreção do vírus vacinal por estes participantes. Podemos conjecturar que a alta densidade populacional nesta comunidade e uma cobertura vacinal consideravelmente elevada contribuíram para a exposição destes participantes ao vírus derivado da vacina. Possíveis fontes de transmissão incluem outras crianças imunizadas na mesma família ou o convívio estreito de crianças de diferentes domicílios frequentando creches informais, que são comuns em comunidades com as características de Manguinhos. Para identificar, de forma conclusiva, como esses indivíduos ingeriram a cepa vacinal, excretando-a nas fezes, seriam necessários estudos especialmente desenhados para investigar esta questão.

6 Conclusões

O estudo foi capaz de identificar a circulação de rotavírus vacinal (G1P[8]) em recém-nascidos e lactentes moradores de Manguinhos, Rio de Janeiro.

A eliminação de G1P[8] vacinal ocorreu, em média, após 8 dias da administração das duas doses de Rotarix[®], sendo mais frequente após D1.

A incidência de DDA associada ao rotavírus foi baixa ao longo do estudo e houve apenas duas amostras identificadas com genótipos diferentes do vacinal. Nenhum participante evoluiu com gravidade da doença diarreica, e todos foram tratados ambulatorialmente com TRO. É importante ressaltar que os recém-nascidos e lactentes jovens que excretaram G1P[8] vacinal eram completamente assintomáticos no momento da detecção do vírus nas amostras fecais. A circulação do vírus vacinal, identificada em vários momentos do estudo, reforça o papel que a transmissão fecal-oral do rotavírus vacinal desempenha na imunidade de rebanho.

Observou-se também baixa frequência de eventos supostamente atribuíveis à vacinação, corroborando a segurança da vacina Rotarix[®].

7 Perspectivas

Atualmente, as diretrizes nacionais não recomendam a administração de Rotarix® em UTI neonatal/pediátrica, devido à preocupação de que a exposição de bebês com menos de seis semanas de idade ao vírus vacinal resulte em eventos adversos graves. Embora nossos resultados não possam ser amplamente generalizados, eles fornecem evidências clínicas para apoiar a administração da Rotarix® em tais cenários, visto que os participantes do estudo permaneceram assintomáticos ao excretar o vírus vacinal. Estudos com populações maiores e em outros ambientes poderão fornecer a validação necessária para tal recomendação, tornando-se uma estratégia para imunizar um segmento de lactentes elegíveis que, até então permaneceram desprotegidos.

8 Referências bibliográficas

1. Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ.* 2008;86(9):710–7.
2. Kotloff KL. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2017;64(4):799–814. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>
3. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* [Internet]. 2020 Oct;396(10258):1204–22. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30925-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30925-9/fulltext)
4. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* [Internet]. 2016 Oct;388(10053):1545–602. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616316786>
5. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr.* 2018;172(10):958–65.
6. Tate J, Burton A, Boschi-Pinto C, Parashar U, Agocs M, Serhan F. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis.* 2016;62(Suppl 2).
7. Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus Surveillance - Worldwide, 2001-2008 [Internet]. Vol. 57, *MMWR.* 2008. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5746a3.htm>
8. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *The Lancet* [Internet]. 2006 Jul;368(9532):323–32.

Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606688156>

9. Rota Council. The Epidemiology and Disease Burden of Rotavirus [Internet]. [cited 2020 Jun 16]. Available from: <https://rotacouncil.org/wp-content/uploads/2019/05/ROTA-Brief3-Burden-SP-1.pdf>
10. Patel MM, Glass R, Desai R, Tate JE, Parashar UD. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: How far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2012;12(7):561–70. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70029-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70029-4)
11. Cohen AL, Platts-Mills JA, Nakamura T, Operario DJ, Antoni S, Mwenda JM, et al. Aetiology and incidence of diarrhoea requiring hospitalisation in children under 5 years of age in 28 low-income and middle-income countries: findings from the Global Pediatric Diarrhea Surveillance network. *BMJ Glob Health* [Internet]. 2022 Sep 5;7(9):e009548. Available from: <https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2022-009548>
12. Kim AHJ, Hogarty MP, Harris VC, Baldrige MT. The Complex Interactions Between Rotavirus and the Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;10(January).
13. 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: A Review. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37(3):e63–5.
14. 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(1).
15. Kale PL, Andreozzi VL, Nobre FF. Time Series Analysis of Deaths Due to Diarrhoea in Children in Rio de Janeiro, Brazil, 1980-1998. *J Health Popul Nutr* [Internet]. 2004;22(1):27–33. Available from: <http://www.jstor.org/stable/23499006>
16. Victora CG. Mortalidade por diarreia: O que o mundo pode aprender com o Brasil? *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(1):3–5.
17. Rasella D, Aquino R, Barreto ML. Reducing Childhood Mortality From Diarrhea and Lower Respiratory Tract Infections in Brazil. *Pediatrics* [Internet]. 2010 Sep 1;126(3):e534–40. Available from:

<https://publications.aap.org/pediatrics/article/126/3/e534/66136/Reducing-Childhood-Mortality-From-Diarrhea-and>

18. Boccolini CS, Boccolini P de MM. Relação entre aleitamento materno e internações por doenças diarreicas nas crianças com menos de um ano de vida nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal, 2008. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2011;20(1):19–26.
19. Santosham M, Chandran A, Fitzwater S, Fischer-Walker C, Baqui AH, Black R. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *The Lancet* [Internet]. 2010;376(9734):63–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60356-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60356-X)
20. França EB, Lansky S, Rego MAS, Malta DC, França JS, Teixeira R, et al. Leading causes of child mortality in Brazil, in 1990 and 2015: Estimates from the Global Burden of Disease study. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2017;20:46–60.
21. World Health Organization. Rotavirus vaccines: an update. Vols. 51–52, *Weekly Epidemiological Report*. 2009.
22. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO position paper. 2013.
23. World Health Organization. Rotavirus vaccines: WHO position paper - July 2021. *Weekly Epidemiological Report* [Internet]. 2021;96(28):301–20. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/weekly-epidemiological-record-vol.-28-2021-96-301-320>
24. Estes MK, HB G. *Fields Virology - Rotaviruses*. 6th ed. Knipe DM, Howley PM, editors. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2013. 1347–1401 p.
25. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol*. 2004 Oct 1;78(19):10213–20.
26. Surendran S. Review Article: Rotavirus Infection: Molecular Changes and Pathophysiology. *EXCLI J* [Internet]. 2008;7(7):154–62. Available from: http://excli.de/vol7/surendran08_2008/surendran_10_09_proof.pdf
27. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3.
28. Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: Identification of the etiologic agent. *Science* (1979). 1963;141(3578):359–60.

29. Bishop RuthF, Davidson G, Holmes I, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *The Lancet* [Internet]. 1974 Feb;303(7849):149–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673674924404>
30. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger J, Derrick J. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *The Lancet* [Internet]. 1974 Jul;304(7872):61–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673674916316>
31. Flewett TH, Woode GN. The rotaviruses. *Arch Virol* [Internet]. 1978 Mar;57(1):1–23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01315633>
32. Linhares A da C, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará, Brasil (nota prévia). *Rev Inst Med Trop São Paulo* [Internet]. 1977;19(4):278–9. Available from: <https://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/view/197907>
33. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397–413.
34. Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, et al. Candidate new Rotavirus species in sheltered Dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):660–3.
35. Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Földes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber’s bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2017;48:19–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>
36. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 2012;157(6):1177–82.
37. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnssens J, et al. Widespread Rotavirus H in Commercially Raised Pigs, United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Jul;20(7):1203–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/7/14-0034_article.htm
38. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: Is their surveillance needed? *Vaccine* [Internet]. 2014 Jun;32(27):3367–78. Available

from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X14005635>

39. Cantelli CP, Velloso AJ, Assis RMS de, Barros JJ, Mello FC do A, Cunha DC da, 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(1):1–10.
40. Leite JPG, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(8):745–53.
41. Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012;30(SUPPL. 1):122–30.
42. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group a rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621–9.
43. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases, Kimberlin DW, Barnett ED (Elizabeth D, Lynfield R, Sawyer MH. Red Book: 2021-2024 report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics; 2021. 1146 p.
44. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology* [Internet]. 2009;136(6):1939–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>
45. Richardson S, Grimwood K, Gorrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *The Lancet* [Internet]. 1998 Jun;351(9119):1844–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673697112570>
46. Julian TR. Environmental transmission of diarrheal pathogens in low and middle income countries. *Environ Sci Process Impacts.* 2016;18(8):944–55.
47. Dennehy PH. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2000;19(10 SUPPL.):103–5.

48. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: Surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2015;13(11):1337–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2015.1089171>
49. Rojas M, Dias HG, Gonçalves JLS, Manchego A, Rosadio R, Pezo D, et al. Genetic diversity and zoonotic potential of rotavirus A strains in the southern Andean highlands, Peru. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66(4):1718–26.
50. Malik YS, Bhat S, Dar PS, Sircar S, Dhama K, Singh RK. Evolving Rotaviruses, Interspecies Transmission and Zoonoses. *Open Virol J*. 2020;14(1):1–6.
51. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol* [Internet]. 2018 Nov 29;28(6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2003>
52. Omatola CA, Olaniran AO. Rotaviruses: From Pathogenesis to Disease Control—A Critical Review. *Viruses* [Internet]. 2022 Apr 22;14(5):875. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/5/875>
53. Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Krengel U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2017 Jun;44:190–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X16301725>
54. Mcneal MM, Bernstein DI. Rotavirus. In: Barrett, Alan D.T., Stanberry LR, editor. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. 1st ed. Elsevier Inc; 2009. p. 645–69.
55. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. Vol. 2, *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.; 2012. p. 419–25.
56. Ward RL, Bernstein DI SM. Rotaviruses. In: RD Feigin, JD Cherry, GJ Demmler-Harrison SK, editor. *Feigin & Cherry's Textbook of Pediatrics Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 2245–70.
57. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum Antibody as a Marker of Protection against Natural Rotavirus Infection and Disease. *J Infect Dis* [Internet]. 2000

- Dec;182(6):1602–9. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/317619>
58. Chiba S, Nakata S, Urasawa T, Urasawa S, Yokoyama T, Morita Y, et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *The Lancet* [Internet]. 1986 Aug;328(8504):417–21. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673686921331>
59. O’Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-Rotavirus G Type-Specific and Isotype-Specific Antibodies in Children with Natural Rotavirus Infections. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1994 Mar 1;169(3):504–11. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/169.3.504>
60. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical Immunity after Neonatal Rotavirus Infection. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1983 Jul 14;309(2):72–6. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198307143090203>
61. de Champs C, Laveran H, Peigue-Lafeuille H, Chambon M, Demeocq F, Beytout D. Sequential rotavirus infections: characterization of serotypes and electrophoretotypes. Vol. 142, *Res. Virol. Paris*. 1991.
62. Friedman MG, Galil A, Sarov B, Margalith M, Katzir G, Midthun K, et al. Two Sequential Outbreaks of Rotavirus Gastroenteritis: Evidence for Symptomatic and Asymptomatic Reinfections. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1988 Oct 1;158(4):814–22. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/158.4.814>
63. Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernandez R, Garcia B. Epidemiology of Rotaviruses in a Cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian Children Observed from Birth to the Age of Three Years. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1983 Sep 1;148(3):452–61. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/148.3.452>
64. Mäkelä M, Marttila J, Simell O, Ilonen J. Rotavirus-specific T-cell responses in young prospectively followed-up children. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2004 Jun 8;137(1):173–8. Available from:
<https://academic.oup.com/cei/article/137/1/173/6458029>

65. Ward RL, Bernstein DI, Staat MA. Rotaviruses. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, editors. *Feigin & Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 2245–70.
66. Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2008 Jan;21(1):198–208. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00029-07>
67. Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass I, et al. Protection Conferred by Neonatal Rotavirus Infection against Subsequent Rotavirus Diarrhea. *J Infect Dis*. 1993;168(2):282–7.
68. Haffejee IE. Neonatal rotavirus infections. *Rev Infect Dis*. 1991;13(5):957–62.
69. Perez-Schael I, Daoud G, White L, Urbina G, Daoud N, Perez M, et al. Rotavirus shedding by newborn children. *J Med Virol*. 1984;14(2):127–36.
70. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus Infection in Infants as Protection against Subsequent Infections. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1996 Oct 3;335(14):1022–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199610033351404>
71. Bass ES, Pappano DA, Humiston SG. Rotavirus. *Pediatr Rev* [Internet]. 2007 May 1;28(5):183–91. Available from: <http://pedsinreview.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/pir.28-5-183>
72. O`Ryan MG. Clinical manifestations and diagnosis of rotavirus infection [Internet]. Up to Date. 2020. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-rotavirus-infection#H3096970958>
73. Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, et al. Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting. Estes MK, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Jul 14;7(7):e1002115. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002115>
74. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *The Lancet* [Internet]. 2003 Nov;362(9394):1445–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603146879>

75. Lloyd MB, Lloyd JC, Gesteland PH, Bale JF. Rotavirus Gastroenteritis and Seizures in Young Children. *Pediatr Neurol* [Internet]. 2010 Jun;42(6):404–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899410000937>
76. de Vries LS, Bearden D. Neurologic complications of rotavirus in neonates: More common than we thought? *Neurology* [Internet]. 2015 Jan 6;84(1):13–4. Available from: <https://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000001115>
77. Goldwater P, Rowland K, Power R, Thesinger M, Abbott K, Grieve A, et al. Rotavirus encephalopathy: Pathogenesis reviewed. *J Paediatr Child Health* [Internet]. 2001 Apr 10;37(2):206–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1440-1754.2001.00596.x>
78. Rivero-Calle I, Gómez-Rial J, Martínón-Torres F. Systemic features of rotavirus infection. *Journal of Infection* [Internet]. 2016 Jul;72:S98–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445316300561>
79. Gómez-Rial J, Sánchez Batán S, Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Martínón-Martínez JM, Salas A, et al. Rotavirus infection beyond the gut. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2019 Dec;Volume 12:55–64. Available from: <https://www.dovepress.com/rotavirus-infection-beyond-the-gut-peer-reviewed-article-IDR>
80. Kaiser P, Borte M, Zimmer KP, Huppertz HI. Complications in hospitalized children with acute gastroenteritis caused by rotavirus: a retrospective analysis. *Eur J Pediatr* [Internet]. 2012 Feb 11;171(2):337–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-011-1536-0>
81. Perl S, Goldman M, Berkovitch M, Kozer E. Characteristics of rotavirus gastroenteritis in hospitalized children in Israel. *Isr Med Assoc J* [Internet]. 2011 May;13(5):274–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845967>
82. Foldenauer A, Voßbeck S, Pohlandt F. Neonatal hypocalcaemia associated with rotavirus diarrhoea. *Eur J Pediatr* [Internet]. 1998 Sep 24;157(10):838–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s004310050947>
83. Grimwood K, Coakley JC, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Serum aspartate aminotransferase levels after rotavirus gastroenteritis. *J*

- Pediatr [Internet]. 1988 Apr;112(4):597–600. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347688801793>
84. Gautam R, Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Tam KI, Gentsch JR, Bowen MD. Real-time RT-PCR assays to differentiate wild-type group a rotavirus strains from Rotarix[®] and RotaTeq[®] vaccine strains in stool samples. Vol. 10, Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2014. p. 767–77.
 85. Rose TL, Miagostovich MP, Leite JPG. Rotavirus A genotype G1P[8]: a novel method to distinguish wild-type strains from the Rotarix[®] vaccine strain. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(8):1068–72.
 86. Whiley DM, Ye S, Tozer S, Clark JE, Bletchly C, Lambert SB, et al. Over-diagnosis of Rotavirus Infection in Infants Due to Detection of Vaccine Virus. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2020 Aug 22;71(5):1324–6. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/71/5/1324/5680199>
 87. World Health Organization. Implementing the New Recommendations on the Clinical Management of Diarrhoea Guidelines for Policy Makers and Programme Managers. 2006.
 88. Dennehy PH. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. Curr Infect Dis Rep. 2013 Jun;15(3):242–50.
 89. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. New England Journal of Medicine [Internet]. 2006 Jan 5;354(1):11–22. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa052434>
 90. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. Emerg Infect Dis [Internet]. 2003 May;9(5):565–72. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/5/02-0562_article.htm
 91. 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. Pediatr Infect Dis J [Internet]. 2018 Mar;37(3):e63–5. Available from: <http://journals.lww.com/00006454-201803000-00018>
 92. Leshem E, Lopman B, Glass R, Gentsch J, Bányai K, Parashar U, et al. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and

meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2020 Jun 4];14(9):847–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082561>

93. Steele AD, Neuzil KM, Cunliffe NA, Madhi SA, Bos P, Ngwira B, et al. Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2012;12(1):1. Available from: *BMC Infectious Diseases*
94. Phua KB, Quak SH, Lee BW, Emmanuel SC, Goh P, Han HH, et al. Evaluation of RIX4414, a live, attenuated rotavirus vaccine, in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial involving 2464 Singaporean infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(SUPPL. 1).
95. Hsieh YC, Wu FT, Hsiung CA, Wu HS, Chang KY, Huang YC. Comparison of virus shedding after lived attenuated and pentavalent reassortant rotavirus vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2014;32(10):1199–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.041>
96. Rivera L, Stainier I, Gillard P, Cheuvart B. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain — A randomized , placebo-controlled study in twins. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(51):9509–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.015>
97. Bennett A, Pollock L, Jere KC, Pitzer VE, Lopman B, Parashar U, et al. Infrequent transmission of monovalent human rotavirus vaccine virus to household contacts of vaccinated infants in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*. 2019 Jun 1;219(11):1730–4.
98. Jiang B, Patel M, Glass RI. Polio endgame: Lessons for the global rotavirus vaccination program. Vol. 37, *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2019. p. 3040–9.
99. Ministério da Saúde. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais [Internet]. 2019. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_centros_imunobiologicos_
100. Sicard M, Bryant K, Muller ML, Quach C. Rotavirus vaccination in the neonatal intensive care units: Where are we? A rapid review of recent evidence. *Curr Opin Pediatr*. 2020;32(1):167–91.

101. Patel MM, Parashar UD. Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization programs. Vol. 200, *Journal of Infectious Diseases*. 2009.
102. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, et al. Rotavirus disease and vaccination: Impact on genotype diversity. Vol. 4, *Future Microbiology*. 2009. p. 1303–16.
103. Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: A review. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2008 Sep;43(1):1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653208001583>
104. Hungerford D, Vivancos R, Read JM, Pitzer VE, Cunliffe N, French N, et al. In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across 12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *Eurosurveillance*. 2016;21(2).
105. Patton JT. Rotavirus diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. *Discov Med*. 2012;13(68):85–97.
106. Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, Martins CMM de A, Bóia MN, et al. Rotavirus Genotype Distribution after Vaccine Introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2009 Jan;15(1):95–7. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/1/07-1136_article.htm
107. Carvalho-Costa FA, Volotão E de M, de Assis RMS, Fialho AM, de Andrade J da SR, Rocha LN, et al. Laboratory-based Rotavirus Surveillance During the Introduction of a Vaccination Program, Brazil, 2005–2009. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2011 Jan;30:S35–41. Available from: <http://journals.lww.com/00006454-201101001-00008>
108. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2012 Feb;12(2):136–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309911702535>
109. Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, et al. Global Mortality Associated with Rotavirus Disease among

Children in 2004. *J Infect Dis* [Internet]. 2009 Nov;200(s1):S9–15. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/605025>

110. Lee B. Update on rotavirus vaccine underperformance in low- to middle-income countries and next-generation vaccines. Vol. 17, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 1787–802.
111. Stevanim LF. E agora, Zé? *Radis*. 2019 Jan;196:10–8.
112. Pedro RS, Carvalho MS, Girianelli VR, Damasceno LS, Leal I, da Cunha DC, et al. A populational-based birth cohort study in a low-income urban area in Rio de Janeiro, Brazil: Implementation and description of the characteristics of the study. *Cad Saude Publica*. 2019;35(5).
113. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(24):2321–34.
114. Lugon P, Fuller T, Damasceno L, Calvet G, Resende PC, Matos AR, et al. SARS-CoV-2 infection dynamics in children and household contacts in a slum in Rio de Janeiro. *Pediatrics*. 2021;148(1):1–8.
115. Damasceno L, Terzian ACB, Fuller T, Estofolete CF, Andrade A, Kroon EG, et al. Why did zika perinatal outcomes differ in distinct regions of Brazil? An exploratory study of two cohorts. *Viruses*. 2021;13(5):1–12.
116. Engstrom EM, Fonseca Z, Leinmann B. *A experiência do Território Escola Manguinhos na Atenção Primária à Saúde*. Rio de Janeiro; 2012.
117. Alem AIPP. Breve relato sobre a formação das divisões administrativas na Cidade do Rio de Janeiro: período de 1961 a 2010 [Internet]. Alem A (Instituto PP, editor. Rio de Janeiro: Instituto Pereira Passos; 2010. 22 p. Available from: www.armazemdedados.rio.rj.gov.br.
118. Fernandes TM, Costa RGR. *Histórias de pessoas e lugares: memórias das comunidades de Manguinhos* [Internet]. Editora FIOCRUZ; 2009. Available from: <http://books.scielo.org/id/kprj8>

119. Instituto Pereira Passos. Índice de Desenvolvimento Social (IDS) por Áreas de Planejamento (AP), Regiões de Planejamento (RP), Regiões Administrativas (RA), Bairros e Favelas do Município do Rio de Janeiro - 2010 [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Pereira Passos; 2018 [cited 2022 Nov 23]. Available from: <https://www.data.rio/documents/%C3%ADndice-de-desenvolvimento-social-ids-por-%C3%A1reas-de-planejamento-ap-regi%C3%B5es-de-planejamento-rp-regi%C3%B5es-administrativas-ra-bairros-e-favelas-do-munic%C3%ADpio-do-rio-de-janeiro-2010/about>
120. Santos IS, Goldstein RA. Rede de Pesquisa em Manguinhos: sociedade, gestores e pesquisadores em conexão com o SUS [Internet]. Hucitec; 2016. 29–31; 127–129 p. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/17715>
121. Schincariol I. Saúde em construção. Iniciativa Teias leva atenção integrada e inovação para Manguinhos. Revista de Manguinhos [Internet]. 2010;21:32–3. Available from: <https://agencia.fiocruz.br/sites/agencia.fiocruz.br/files/revistaManguinhos/RevistadeManguinhos21.pdf>
122. Lee B, Kader MA, Colgate ER, Carmolli M, Dickson DM, Diehl SA, et al. Oral rotavirus vaccine shedding as a marker of mucosal immunity. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
123. World Health Organization. Sample size determination: a user's manual. 1986; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61764>
124. Handam NB, Santos JAA dos, Moraes Neto AHA de, Alencar MDL, Ignacio CF, Sotero-Martins A. Drinking water quality in Brazilian urban slums. *Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 2020 May 15;15(3):1.
125. Miura H, Kawamura Y, Sugata K, Koshiyama N, Yoshikawa A, Komoto S, et al. Rotavirus vaccine strain transmission by vaccinated infants in the foster home. *J Med Virol*. 2017 Jan;89(1):79–84.
126. Hiramatsu H, Suzuki R, Nagatani A, Boda H, Miyata M, Hattori F, et al. Rotavirus vaccination can be performed without viral dissemination in the neonatal intensive care unit. *Journal of Infectious Diseases*. 2018;217(4):589–96.
127. Anderson EJ. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect Dis*. 2008 Oct 1;8(10):642–9.

128. Dennehy PH, Brady RC, Halperin SA, Ward RL, Alvey JC, Fischer FH, et al. Comparative evaluation of safety and immunogenicity of two dosages of an oral live attenuated human rotavirus vaccine. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005;24(6):481–8.
129. Phua KB, Quak SH, Lee BW, Emmanuel SC, Goh P, Han HH, et al. Evaluation of RIX4414, a live, attenuated rotavirus vaccine, in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial involving 2464 Singaporean infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(SUPPL. 1).
130. Pietsch C, Liebert UG. Rotavirus vaccine effectiveness in preventing hospitalizations due to gastroenteritis: a descriptive epidemiological study from Germany. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2019;25(1):102–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.046>
131. Zaman K, Sack DA, Neuzil KM, Yunus M, Moulton LH, Sugimoto JD, et al. Effectiveness of a live oral human rotavirus vaccine after programmatic introduction in Bangladesh: A cluster-randomized trial. *PLoS Med*. 2017;14(4):1–20.
132. Prelog M, Gorth P, Zwazl I, Kleines M, Streng A, Zlamy M, et al. Universal Mass Vaccination Against Rotavirus: Indirect Effects on Rotavirus Infections in Neonates and Unvaccinated Young Infants Not Eligible for Vaccination. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2016 Aug 15 [cited 2021 Apr 18];214(4):546–55. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw186>
133. Plenge-Bönig A, Soto-Ramírez N, Karmaus W, Petersen G, Davis S, Forster J. Breastfeeding protects against acute gastroenteritis due to rotavirus in infants. *Eur J Pediatr*. 2010 Dec;169(12):1471–6.
134. Victora CesarG, Vaughan JP, Lombardi C, Fuchs SandraMC, Gigante LucianaP, Smith PeterG, et al. Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *The Lancet* [Internet]. 1987 Aug;330(8554):319–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687909020>
135. Golding J, Emmett PM, Rogers IS. Gastroenteritis, diarrhoea and breast feeding. *Early Hum Dev* [Internet]. 1997 Oct;49:S83–103. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378378297000558>


136. Linhares AC, Mascarenhas JDAP, Gusmão RHP, Gabbay YB, Fialho AM, Leite JPG. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: Nosocomial transmission of a P[6] G2 strain. *J Med Virol*. 2002;67(3):418–26.
137. Yoon HS, Lim J, Sohn YH, Kim SY. Incidence, Clinical Characteristics, and Genotype Distribution of Rotavirus in a Neonatal Intensive Care Unit 5 Years After Introducing Rotavirus Vaccine. *Front Pediatr*. 2022 Feb 17;10.
138. Steele AD, Madhi SA, Cunliffe NA, Vesikari T, Phua KB, Lim FS, et al. Incidence of rotavirus gastroenteritis by age in African, Asian and European children: Relevance for timing of rotavirus vaccination. Vol. 12, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2016. p. 2406–12.
139. At Thobari J, Damayanti W, Haposan JH, Nirwati H, Iskandar K, Samad, et al. Safety and immunogenicity of human neonatal RV3 rotavirus vaccine (Bio Farma) in adults, children, and neonates in Indonesia: Phase I Trial. *Vaccine*. 2021 Jul;39(33):4651–8.
140. Bines JE, At Thobari J, Satria CD, Handley A, Watts E, Cowley D, et al. Human neonatal rotavirus vaccine (RV3-BB) to target rotavirus from birth. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(8):719–30.
141. Roczo-Farkas S, Kirkwood CD, Cowley D, Barnes GL, Bishop RF, Bogdanovic-Sakran N, et al. The impact of rotavirus vaccines on genotype diversity: A comprehensive analysis of 2 decades of Australian surveillance data. *Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(4):546–54.
142. Carmo GMI do, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: A time-series analysis. *PLoS Med*. 2011;8(4):11.
143. Atchison CJ, Stowe J, Andrews N, Collins S, Allen DJ, Nawaz S, et al. Rapid Declines in Age Group–Specific Rotavirus Infection and Acute Gastroenteritis Among Vaccinated and Unvaccinated Individuals Within 1 Year of Rotavirus Vaccine Introduction in England and Wales. *Journal of Infectious Diseases*. 2016 Jan 15;213(2):243–9.
144. Bruun T, Salamanca BV, Bekkevold T, Døllner H, Gibory M, Gilje AM, et al. Impact of the Rotavirus Vaccination Program in Norway after Four Years with High Coverage. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021;40(4):368–74.

145. Salinas B, Schael IP, Linhares AC, Ruiz Palacios GM, Guerrero ML, Yarzabal JP, et al. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005;24(9):807–16.
146. Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, et al. Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(12):1121–30.
147. Becker-Dreps S, Bucardo F, Vilchez S, Zambrana LE, Liu L, Weber DJ, et al. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: A prospective, population-based study in Nicaragua. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2014;33(11):1156–63.
148. Cantelli CP, Fumian TM, Malta FC, da Cunha DC, Brasil P, Nordgren J, et al. Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2020;82(March):104280. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104280>
149. Sabbe M, Berger N, Blommaert A, Ogunjimi B, Grammens T, Callens M, et al. Sustained low rotavirus activity and hospitalisation rates in the post-vaccination era in Belgium, 2007 to 2014. *Eurosurveillance*. 2016;21(27).
150. MacArtney KK, Porwal M, Dalton D, Cripps T, Maldigri T, Isaacs D, et al. Decline in rotavirus hospitalisations following introduction of Australia’s national rotavirus immunisation programme. *J Paediatr Child Health*. 2011;47(5):266–70.
151. Leshem E, Tate JE, Steiner CA, Curns AT, Lopman BA, Parashar UD. Acute gastroenteritis hospitalizations among children following implementation of the rotavirus vaccine. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2015;313(22):2282–4.
152. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*. 2006;368(9532):323–32.
153. Poelaert D, Pereira P, Gardner R, Standaert B, Benninghoff B. A review of recommendations for rotavirus vaccination in Europe: Arguments for change. *Vaccine*. 2018 Apr;36(17):2243–53.
154. Prelog M, Gorth P, Zwazl I, Kleines M, Streng A, Zlamy M, et al. Universal Mass Vaccination Against Rotavirus: Indirect Effects on

Rotavirus Infections in Neonates and Unvaccinated Young Infants Not Eligible for Vaccination. *Journal of Infectious Diseases*. 2016 Aug 15;214(4):546–55.

9 Anexos

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: EPIDEMIOLOGIA DO ROTAVÍRUS EM RECÉM NATOS E LACTENTES DE UMA COORTE INFANTIL EM MANGUINHOS e DO PERÍODO PRÉ-VACINAL A 2 ANOS DE IDADE		
Pesquisador: Patricia Brasil		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 31505914.8.0000.5262		
Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ		
Patrocinador Principal: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 688.566		
Data da Relatoria: 09/06/2014		
Apresentação do Projeto:		
<p>A cobertura vacinal elevada poderia introduzir pressão seletiva nos rotavírus, disparando alterações genéticas e antigênicas que poderiam enfraquecer a efetividade do programa de vacinação. Desenho do estudo: Coorte prospectiva. População do estudo: Recém-nascidos e lactentes da Coorte do Estudo de Incidência de Dengue em Manguinhos. População do estudo: Recém-nascidos e lactentes da Coorte do Estudo de Incidência de Dengue em Manguinhos. Locais de estudo: O estudo será conduzido nos Serviços de Saúde da Família do Territórios Integrados de Atenção à Saúde (TEIAS) de Manguinhos, da Fiocruz do Rio de Janeiro (Centro de Saúde Manguinhos) e Clínica de Saúde da Família Victor Valla. Seguimento: Os recém-natos e lactentes da coorte serão acompanhados nas consultas de rotina do projeto e durante os episódios de DDA. Amostras de fezes serão coletadas nos recém-nascidos e lactentes da seguinte forma: - Até 2 meses de vida com intervalos quinzenais. - Após a 1ª dose da vacina contra rotavírus. - Após a 2ª dose da vacina contra rotavírus. - Durante episódios de doença diarreica aguda. - Vigilância de diarreia: serão realizados telefonemas semanais e visitas domiciliares quinzenais para busca ativa de DDA, entre os participantes do estudo. Coleta, transporte e conservação de amostras fecais: - Coletores fecais plásticos sem conservantes serão utilizados para a coleta das amostras de fezes. As amostras serão retiradas com espátulas de madeira diretamente das fraldas descartáveis</p>		
Endereço: Avenida Brasil 4365		
Bairro: Manguinhos		CEP: 21.045-900
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)3865-9585	E-mail: cep@pec.fiocruz.br	

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 688.566

utilizadas pelas crianças após evacuação espontânea durante as consultas na ENSP ou na Clínica de Saúde da Família Victor Valla. No caso de recém-natos, a equipe de assistência irá buscar as fezes no domicílio do paciente. – As amostras serão conservadas à temperatura de 4°C em refrigerador específico para amostras de material biológico e encaminhadas ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: - Detecção de genótipos do Rotavírus diferentes dos presentes na vacina disponível no Programa Nacional de Imunização.

Objetivo Secundário: - Detectar os genótipos de rotavírus presentes nas fezes de recém-natos e lactentes da coorte antes e após a primeira dose da vacina, e após a segunda dose da vacina até os 2 anos de idade; - Avaliar se os recém-natos/lactentes já entraram em contato com o rotavírus antes da primeira dose da vacina; - Verificar se a primeira dose da vacina aumentaria a efetividade desta, conferindo maior proteção contra a infecção pelo rotavírus; - Detectar o agente etiológico da DDA em episódios de gastroenterite no paciente acometido e em seus familiares e, porventura de algum animal doméstico; - Descrever o perfil sócio-econômico e ambiental dos recém natos e lactentes da coorte com DDA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos relacionados com a participação da criança, já que as fezes serão coletadas diretamente da fralda. Caso haja constrangimento em realizar a coleta de fezes na sala de espera do ambulatório, esta poderá ser coletada no banheiro do posto ou no consultório médico, durante o atendimento da criança.

Benefícios: O paciente estará colaborando com um estudo científico que ajudará no entendimento da infecção pelo Rotavírus na população infantil até 2 anos de idade. A criança receberá atendimento pelos médicos da Pesquisa sempre que tiver doença diarreica aguda. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e sigilosas. Essas informações não serão divulgadas de forma a possibilitar a identificação e estarão protegidas por códigos e senhas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a Saúde Pública.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados.

Recomendações:

Incluir o nome da Dra. Mayumi na lista da equipe (item 13).

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 688.566

TCLE - É informado que serão realizadas "palestras dirigidas ao público" não mencionadas no Cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Além das recomendações descritas acima, não há pendências nem inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

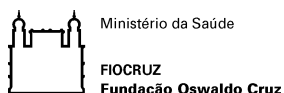
Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 16 de Junho de 2014

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.045-900
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@pec.fiocruz.br

Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada para participar da pesquisa **Epidemiologia do rotavírus em recém-natos e lactentes de uma coorte infantil em Manguinhos – do período pré-vacinal a 2 anos de idade**. A pesquisadora responsável por este estudo é a Dra. Patrícia Brasil, chefe do Laboratório de Doenças Febris Agudas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Você foi convidada porque está cadastrada e é assistida pelo serviço de Saúde da Família do TEIAS de Manguinhos e não pretende se mudar no próximo ano. Se você permitir, o seu filho permanecerá no estudo pelo período mínimo de dois anos. A participação do seu filho não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo principal deste estudo é:

1. Avaliar o impacto da vacinação contra o rotavírus em recém natos e lactentes de uma coorte em Manguinhos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em entrevistas e consultas médicas que serão anotadas em formulários próprios. Os materiais clínicos que serão coletados do (a) seu (sua) filho (a) nas seguintes ocasiões:

- Na primeira consulta ambulatorial, idealmente com 30 dias de vida (pode ser coletado em qualquer visita ao ambulatório após o 30º dia de vida) – saliva coletada a partir de *swab* oral. O *swab* é uma espécie de cotonete feito de material macio, sem conservantes, que irá coletar a saliva do bebê em contato com a mucosa oral. Caso não possa ser coletado com 30 dias de vida, o *swab* será coletado em qualquer consulta;
- Em 5 ocasiões: a cada 15 dias, até ele (a) completar 2 meses de idade, entre a 1ª e a 2ª dose da vacina contra o Rotavírus, e após a 2ª dose da vacina. Também serão coletadas fezes sempre que ele (a) tiver diarreia, para saber se essa diarreia foi por causa do Rotavírus ou não. Nestas ocasiões, poderão ser coletadas fezes dos moradores do domicílio da criança com diarreia, incluindo animais, se houver. As amostras de fezes serão retiradas com espátula de madeira (fornecida pela equipe) diretamente das fraldas descartáveis utilizadas pelas crianças após evacuação espontânea, durante as consultas no CSEGSF/ENSP ou na Clínica de Saúde da Família Victor Valla. No caso de recém-nascidos, a equipe de assistência irá buscar as fezes no domicílio do paciente.

Não há riscos relacionados com a participação do seu filho, já que a coleta da saliva será realizada com *swab* confeccionado de material macio e sem conservantes, diretamente da boca do bebê; e as fezes serão coletadas diretamente da fralda. Caso você se sinta constrangida de realizar a

coleta de fezes na sala de espera do ambulatório, você poderá realizar a coleta no banheiro do posto ou no consultório médico, durante o atendimento do seu filho.

Os benefícios relacionados com a sua participação são os seguintes:

Você estará colaborando com um estudo científico que ajudará no entendimento da infecção pelo Rotavírus na população infantil até 2 anos de idade.

Seu/sua filho (a) receberá atendimento pelos médicos pediatras da Pesquisa sempre que tiver doença diarreica aguda.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Essas informações não serão divulgadas de forma a possibilitar sua identificação e estarão protegidos por códigos e senhas.

Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12.

Os resultados serão divulgados em palestras dirigidas ao público participante e artigos científicos.

Você receberá uma via deste termo com o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

“Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa. O Comitê de Ética é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade”.

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ - Avenida Brasil, 4365 – Maguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3865-9585 e 3865-9107 Fax: (21) 3865-9585
E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

Pesquisador Principal ou Membro da Equipe que obteve o termo
Av Brasil 6395, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)
Sala 109 subsolo do Hospital
Tel: 3965-9110
CEP da ENSP - Tel: 2598-2863

Declaro que entendi os objetivos e benefícios de minha participação na pesquisa, e concordo em participar.

Autorizo que a saliva do (a) meu/minha filho (a) seja coletada através de *swab* oral na primeira consulta ambulatorial.

Autorizo que as fezes do (a) meu/minha filho (a) sejam coletadas a cada 15 dias, até ele completar 2 meses de idade.

Autorizo que as fezes do (a) meu/minha filho (a) sejam coletadas entre a 1ª e a 2ª dose da vacina contra Rotavírus, e após a 2ª dose da vacina.

Autorizo a coleta de fezes do (a) meu/minha filho (a) quando tiver diarreia.

Data: ____/____/____

Nome da mãe ou responsável

Assinatura da mãe ou responsável

Apêndice 3 - Formulário dados sociodemográficos

FICHA SÓCIO-DEMOGRÁFICA

"EPIDEMIOLOGIA DO ROTAVÍRUS EM RECÉM NATOS E LACTENTES DE UMA COORTE INFANTIL EM MANGUINHOS - DO PERÍODO PRÉ-VACINAL A 2 ANOS DE IDADE"

NOME DO PACIENTE: _____

NOME DA MÃE DO PACIENTE: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ Nº REGISTRO NO ESTUDO: _____

ENDEREÇO: _____

COMUNIDADE: _____

TELEFONES PARA CONTATO: _____

GRAU DE ESCOLARIDADE DA MÃE: () ENSINO FUNDAMENTAL INCOMPLETO () ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO
() ENSINO MÉDIO INCOMPLETO () ENSINO MÉDIO COMPLETO () ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO () ENSINO SUPERIOR COMPLETO

OCUPAÇÃO DA MÃE: _____

RENDA (EM SALÁRIOS MÍNIMOS): _____

TIPO DE MORADIA: () APARTAMENTO () CASA DE TIJOLO/ALVENARIA () CASA DE MADEIRA () OUTROS, ESPECIFIQUE:

Nº DE CÔMODOS NO DOMICÍLIO: _____

Nº DE RESIDENTES NO DOMICÍLIO: () ADULTOS () CRIANÇAS

ÁGUA ENCANADA? () SIM () NÃO

SE NÃO, QUAL É A PROCEDÊNCIA DA ÁGUA? () POÇO () NASCENTE () CARRO-PIPA () COLETA DE ÁGUA DE CHUVA

ÁGUA POTÁVEL? () SIM () NÃO

ESGOTO FECHADO? () SIM () NÃO

SE NÃO, COMO SÃO DESPEJADOS OS DEJETOS? () FOSSA () VALA () DIRETAMENTE EM RIO

ANIMAIS NO DOMICÍLIO? () SIM () NÃO

SE SIM, QUAIS? () CÃO () GATO () PÁSSARO () OUTROS: _____

DATA DA VISITA: ___/___/___

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO: _____

Apêndice 4 - Formulário individual de atendimento

FICHA DE CONSULTA DO LACTENTE

"EPIDEMIOLOGIA DO ROTAVÍRUS EM RECÉM NATOS E LACTENTES DE UMA COORTE INFANTIL EM MANGUINHOS - DO PERÍODO PRÉ-VACINAL A 2 ANOS DE IDADE"

Dados de identificação

1. Nome do paciente: _____
2. Nome da mãe do paciente: _____
3. Data de nascimento: ____/____/____
4. Idade na consulta: ____ meses ____ dias
5. Sexo: () M () F
6. Nº Registro no estudo: _____
7. Data da consulta: ____/____/____
8. Endereço: _____
9. Comunidade: _____
10. Telefones para contato: _____

Interrogatório sintomatológico

11. Diarreia: () Sim () Não () Não sabe informar
12. Se sim, data de início: ____/____/____ Data do término: ____/____/____
13. Diarreia após dose de vacina contra Rotavírus? () Sim () Não () Não sabe informar () Não se aplica

SÓ PREENCHER OS ITENS 14 A 21 NA PRESENÇA DE DIARREIA

14. Se sim, quando recebeu a dose da vacina contra Rotavírus? ____/____/____
15. Nº evacuações/dia: ()
16. Características das fezes: () Fezes pastosas () Fezes líquidas () Fezes semi-líquidas
17. Fezes com sangue: () Sim () Não () Não sabe informar
18. Fezes com pús: () Sim () Não () Não sabe informar
19. Fezes com muco: () Sim () Não () Não sabe informar
20. Outros indivíduos no domicílio com diarreia? () Sim () Não () Não sabe informar
21. Se sim, quem? _____
22. Febre: () Sim () Não () Não sabe informar
23. Se sim, data de início: ____/____/____ Data do término: ____/____/____
() Tax.máx. aferida: ____ °C
24. Vômitos: () Sim () Não () Não sabe informar
25. Se sim, data de início: ____/____/____ () Nº episódios/dia: _____
26. Recusa alimentar: () Sim () Não () Não sabe informar

27. Sintomas respiratórios: () Sim () Não () Não sabe informar
28. Quais? () Coriza () Tosse
29. Tipo de alimentação: () 0-30 dias LM exclusivo () 1 a 4 meses LM exclusivo () 4 a 6 meses LM exclusivo () LM e fórmula () LM e alimentos () Fórmula e alimentos () LM, fórmula e alimentos () Fórmula exclusiva
30. Alergia/intolerância alimentar? () Sim () Não () Não sabe informar
31. Se sim, a qual(is) alimento(s)? _____
32. Frequenta creche? () Sim () Não () Não sabe informar
33. Animais no domicílio? () Sim () Não () Não sabe informar
34. Se sim, qual(is)? _____

Exame físico

35. Peso(g): _____ 36. Estatura (cm): _____ 37. Perímetro cefálico (cm): _____
38. Temperatura axilar (°C): _____
39. Estado geral: () Bom () Regular () Grave
40. Hidratação: () Hidratado () Hipoidratado () Desidratado
41. Se desidratado: () Saliva espessa () Olhos encovados () Fontanela deprimida () Diurese protraída
42. Sinal da prega presente? () Sim () Não () Não se aplica
43. Tempo de preenchimento capilar: () Normal (<2 segundos) () Anormal (>2 segundos)
44. Estado de consciência: () Normal () Sonolência/irritação () Torpor
45. Alterações de pele: () Sim () Não Descrever: _____
46. Gânglios linfáticos: () Normal () Hipertrofia Descrever: _____
47. Nariz (coriza/obstrução): () Sim () Não
48. Orofaringe normal: () Sim () Não Descrever: _____
49. Otoscopia realizada: () Sim () Não Descrever: _____

Aparelho Respiratório

50. FR: _____ irpm 51. Tiragem: () Sim () Não 52. BAN: () Sim () Não 53. Gemência: () Sim () Não
54. Ausculta: () Normal () Alterada Descrever: _____

Aparelho Cardiovascular

55. FC: _____ bpm 56. RCR 2T: () Sim () Não 57. BNF: () Sim () Não 58. Sopros sistólico: () Sim () Não
59. Sopros diastólico: () Sim () Não

Aparelho Digestivo

60. Inspeção de abdome: () Normal () Alterada Descrever: _____

61. Hepatomegalia: () Sim () Não

62. Esplenomegalia: () Sim () Não

Sistema Nervoso

63. Alterações do SN: () Sim () Não Descrever: _____

64. Fontanela anterior: () Normal () Normotensa () Abaulada () Deprimida

65. Rigidez de nuca: () Sim () Não

Conduta

66. Coleta de fezes: () Sim () Não

67. Data da coleta das fezes: ____/____/____

68. Necessidade de terapia de reidratação: () Sim () Não () Não se aplica

69. Se sim: () oral () venosa

70. Prescrição de antiemético: () Sim () Não () Não se aplica

71. Se sim: () via oral () via parenteral

72. Prescrição de antimicrobiano: () Sim Se sim, qual: _____

() Não () Não se aplica

73. Solicitação de hemograma completo? () Sim () Não () Não se aplica

74. Se sim, qual o resultado? Hemácias: _____ Hb: _____ Hto: _____ Leucócitos: _____

Diferencial: ____/____/____/____/____/____/____/____ Plaquetas: _____

75. Solicitação de EAS? () Sim () Não () Não se aplica

76. Resultado: _____

77. Solicitação de urinocultura? () Sim () Não () Não se aplica

78. Resultado: _____

79. Observações: _____

Circulation of Vaccine-Derived Rotavirus G1P[8] in a Vulnerable Child Cohort in Rio de Janeiro

Denise Cotrim da Cunha¹, MD,* Trevon Fuller, PhD,^{†‡} Carina Pacheco Cantelli, PhD,[§]
Marcia Terezinha Baroni de Moraes, PhD,[§] José Paulo Gagliardi Leite, PhD,[§]
Filipe Anibal Carvalho-Costa, MD, PhD,^{||} and Patricia Brasil, MD, PhD[‡]

Background: The expansion of rotavirus (RV) immunization in several countries reduced the burden of acute diarrheal disease (ADD) and diarrhea-associated mortality. Although community transmission of live attenuated monovalent rotavirus vaccine (G1P[8] RV1) virus has been demonstrated in children and household contacts, fecal shedding of these strains in neonates and infants under six weeks of age has never been demonstrated. The objective of the study was to assess ADD and rotavirus vaccine strain shedding before and after immunization through 24 months of age.

Methods: This was a prospective cohort study in a low-resource community in which stool samples were collected from neonates from 15 to 45 days of age every 2 weeks, after both doses of G1P[8] RV1, and in subsequent ADD episodes until 2 years of age. RV was detected and genotyped in stool samples by RT-PCR.

Results: We enrolled 242 participants who were followed for an average of 23 months. The specific prevalence of G1P[8] RV1 virus was 3.3% in neonates and infants less than six weeks of age, 50% after the first dose, and 25.6% after the second dose. Among the 70 participants with ADD, G1P[8] RV1 virus was identified in only one participant (1.4% prevalence).

Conclusions: In vaccinated children, there were no breakthrough infections with G1P[8] RV1 and ADD was rare supporting high vaccine effectiveness. We observed G1P[8] RV1 virus shedding among neonates and infants before the first vaccine dose, providing evidence of transmission of the vaccine strain from immunized children to those who are not yet vaccinated.

Key Words: rotavirus, community transmission, vaccination, public health, cohort, children

(*Pediatr Infect Dis J* 2022;XX:00-00)

INTRODUCTION

Acute diarrheal diseases (ADD) represent an important cause of infant mortality in low-income countries¹ and it is estimated that 1 in 8 deaths among children under 5 is associated with

diarrheal illness.² In the latest Global Burden of Diseases Report, diarrheal diseases continue to rank among the top five diseases in all age groups, ranking third in the 0–9 age group.³ Among the etiologic agents of diarrhea, group A rotaviruses (RVA) are still recognized as one of the most prevalent at the global scale, being responsible for 128,515 annual deaths and more than 258 million episodes of diarrhea in children under five years old.⁴

Since 2009, the World Health Organization (WHO) has recommended the inclusion of RVA vaccines in immunization programs in all countries, a recommendation that was reiterated in 2013 and 2021.^{5–7} Currently, one of the most widely utilized RVA vaccines is an oral live, attenuated vaccine against the G1P[8] strain (marketed as Rotarix, Glaxo Smith Kline, Philadelphia, Pennsylvania), one of the most prevalent genotypes.⁷ This human monovalent rotavirus vaccine (G1P[8] RV1) also has some efficacy against the G2P[4], G3P[8], and G12P[8] genotypes.^{8–12} With the expansion of RVA immunization in several countries, there has been a reduction in the burden of ADD and a decrease of 22% to 50% in diarrhea-associated mortality.^{4,13,14}

Following immunization, G1P[8] RV1 virus can be shed in feces^{14,15} and can be transmitted to unvaccinated individuals.^{16–18} Such transmission has benefits and risks from a public health standpoint. On the one hand, an unvaccinated individual exposed to the vaccine strain acquires immunity to RVA, while on the other, the risk that such exposure can cause a symptomatic infection exists, especially in immunocompromised subjects. A population in which this risk has raised concern is neonates and infants under six weeks of age who are not yet old enough to receive the first dose of G1P[8] RV1. Although community transmission of G1P[8] RV1 virus has been demonstrated in children and household contacts,¹⁸ fecal shedding of these strains in neonates and infants under six weeks of age has never been demonstrated. The objective of the study was to follow neonates until 24 months of age, to test for the shedding of vaccine-derived rotavirus strains before and after immunization, and to monitor them for the presence of ADD.

MATERIAL AND METHODS

We conducted a prospective cohort study from December 2014 to September 2019 in the community of Manginhos in the Northern region of the city of Rio de Janeiro, Brazil. Manginhos has a population of approximately 35,000 and a low human development index.¹⁹ Many families live on land that they do not officially own and lack access to municipal water, sewage, and garbage collection systems. Several families routinely live near one another, sometimes sharing the same room. Children of different ages often interact during play or at informal nurseries where a single daycare provider is responsible for children of different ages from a variety of households.

G1P[8] RV1 has been distributed for free in Brazil since 2006 at public health clinics^{20,21} and the average vaccination rate during the study period in the city of Rio de Janeiro was 93.8%. All of the infants between 0 and 7 days of life who arrived consecutively at a primary health care center were offered enrollment. After

Accepted for publication November 1, 2022.

*Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; †Institute of the Environment and Sustainability, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California; ‡Acute Febrile Illnesses Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; §Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ||Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematics, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

This work was supported by the Carlos Chagas Foundation for the Advancement of Science of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) E-26/200.935/2022, E-26/211.565/2019, E-26/210.146/2020-COVID to PB and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) 311562/2021-3 to PB.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (www.pidj.com).

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/22/XX:XX-0000

DOI: 10.1097/INF.0000000000003784

The Pediatric Infectious Disease Journal • Volume XX, Number XX, XXX 2022

www.pidj.com | 1

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

inclusion, stool sample collection and study visits with a pediatrician occurred every two weeks for the first two months of life. Subsequently, study visits and sample collection occurred after the first and second doses of G1P[8] RV1 (at two and four months of age). Furthermore, there were on-demand visits in case of ADD – defined as three or more loose or watery bowel movements in 24 hours – at which stool samples were collected (Table S1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/E880>). ADD within 14 days of vaccination was classified as a vaccine-related adverse event. In addition, there were pediatric checkup visits at eight, 12, 18, and 24 months of life. At study visits, the neonate's vaccination card was verified to determine the date of the vaccine doses. When fecal samples were collected, they were obtained directly from the diaper or brought by the mother/guardian in a plastic container. Active surveillance of ADD was carried out by contacting the parent/guardian by telephone or messaging applications at least once every 3 weeks. In case of diarrhea, the infant was brought to the health care provider for a pediatric consultation. A specific questionnaire was filled out for regular and diarrhea consultations (Text S2, Supplemental Digital Content 2, study forms <http://links.lww.com/INF/E883>). Severe diarrhea was defined as that which required hospitalization for intravenous hydration. The primary outcome was the detection of vaccine-derived strain in stool samples. The secondary outcomes were postvaccination adverse events (Text S2, Supplemental Digital Content 2, study forms 1 for definitions <http://links.lww.com/INF/E883>).

Laboratory Testing

Fecal samples were transported within two hours from healthcare clinics in Manguinhos to the Rotavirus Reference Laboratory – Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LCEV), Oswaldo Cruz Institute, at 4°C. Fecal samples were screened for RVA by RT-qPCR and G/P genotypes were determined by multiplex RT-PCR and/or Sanger nucleotide sequencing.^{16,22–25} In a small subset of the samples, we tested for the presence of the live attenuated vaccine strain (G1P[8] RV1) via real-time RT-qPCR assays for vaccine-specific targets (NSP2 and VP4).²⁶ All stool samples were also tested for norovirus via qualitative RT-qPCR, according to the routine protocols of RRRL-LCEV.

The full description of laboratory assays is presented in Text S1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/E882>.

Statistical analysis

We calculated the frequency of the children at each time point who had a positive test. Based on the average prevalence in Brazil,⁴ we needed to enroll 118 children to estimate frequency in the study population with 95% confidence and 80% power 27 (Text S3, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/INF/E884>). In addition, Kaplan-Meier survival analysis was carried out to estimate the probability of shedding of the live attenuated vaccine strain as a function of the number of days since vaccination. All tests were two-tailed with alpha of 0.05 and were performed with PRISM v. 9.2 (Graphpad Software, San Diego, CA). The study was approved by the local IRB under register number: 31505914.8.0000.5262 and the parent or guardian provided written informed consent.

RESULTS

Among 270 children who were screened, 28 were not included because they did not provide any stool samples for the study (Figure 1). The median duration of follow-up was 23 months (range: 1–42 months). All participants received two doses of G1P[8] RV1. There were three pairs of twins in the cohort. No

comorbidities were identified among the participants. Sociodemographic data from the study participants are shown in Table 1.

During the study period, 890 fecal samples were collected for RVA diagnostic tests with an overall positivity rate of 15%. The prevalence of the G1P[8] RV1 virus was 3.3% before vaccination, 50% after the first dose, and 25.6% after the second dose. The positivity rates for RVA detection in stool samples at different time points in the cohort and the genotypes identified in these samples are shown in Table S2, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/E881>. Of 135 stool samples with rotavirus detected by RT-PCR, 104 (77%) were identified as the vaccine-derived virus (G1P[8] RV1) by VP8 RVA molecular characterization, in particular, the G1P[8] vaccine virus was detected most frequently after the first dose (Figure 2). Targets specific to G1P[8] RV1 (NSP2 and VP4) were detected in 89% of the samples tested.

Among the neonates and young infants (age: 3–46 days of life) who excreted RVA in the feces before the first dose of vaccine ($n = 17$), 35% excreted the vaccine-derived virus (see SDC Table 2 for the rotavirus genotypes identified). They were asymptomatic; most were exclusively breastfed (75%) and none of them had episodes of ADD during the two years of follow-up. Ten of these participants also shed RVA after the first dose of G1P[8] RV1. The mean duration of vaccine-derived strain shedding in feces after the first dose was 8.2 days (range: 1–41 days) and 8.2 days after the second dose (range: 0–27 days) (Figure 3). Thirty infants presented with diarrhea after the first dose of vaccine, 15 of whom shed RVA in their feces. The majority of samples ($n = 14$) were identified as G1P[8] and one sample as G3P[9]. Among those identified as G1P[8], two could not be analyzed by sequencing due to poor sample quality or low viral load and 12 samples were identified through VP8 RVA molecular characterization as the vaccine genotype.

Regarding the second dose of the live attenuated virus vaccine, 26 participants had diarrheal stools following vaccination. Of these, only four (15%) shed RVA in feces, three of whom shed G1P[8] and one G12P[8]. Among those identified as G1P[8], one could not be analyzed by sequencing due to poor sample quality or low viral load and the other two samples had the vaccine genotype confirmed by molecular characterization. Analysis of the spatial distribution of the households before and after the two doses of the vaccine revealed that shedding of the vaccine-derived virus was rare before vaccination, increased considerably after the first dose, and increased further still after the second dose (Figure S1, Supplemental Digital Content, <http://links.lww.com/INF/E885>). It is important to highlight that none of the study participants had bloody stools after a vaccine dose or symptoms suggestive of intussusception. The most frequent postvaccine adverse events reported are shown in Table 2.

Of all ADD episodes unrelated to vaccine reported, none resulted in hospitalization. RVA was detected in seven diarrheal stool samples and the infants' mean age was 9.4 months (range: 6 to 22 months). In one case of acute gastroenteritis caused by rotavirus, the G1P[8] vaccine genotype was identified by sequencing analysis in a 6-month-old infant; in this sample, norovirus was also detected by qualitative RT-PCR. In addition, one child with ADD had G12P[8] and another had G3P[8] detected in stools; both were fully immunized. However, RVA subtypes other than G1P[8] were rarely detected, with G3P[9], G12P[8], and G3P[8] comprising only 0.4% of the stool samples.

DISCUSSION

Although community transmission of G1P[8] RV1 virus to household contacts and vaccine-eligible infants is well documented in the literature,^{17,18} evidence of shedding of the vaccine virus among asymptomatic neonates and infants before 6 weeks of age,

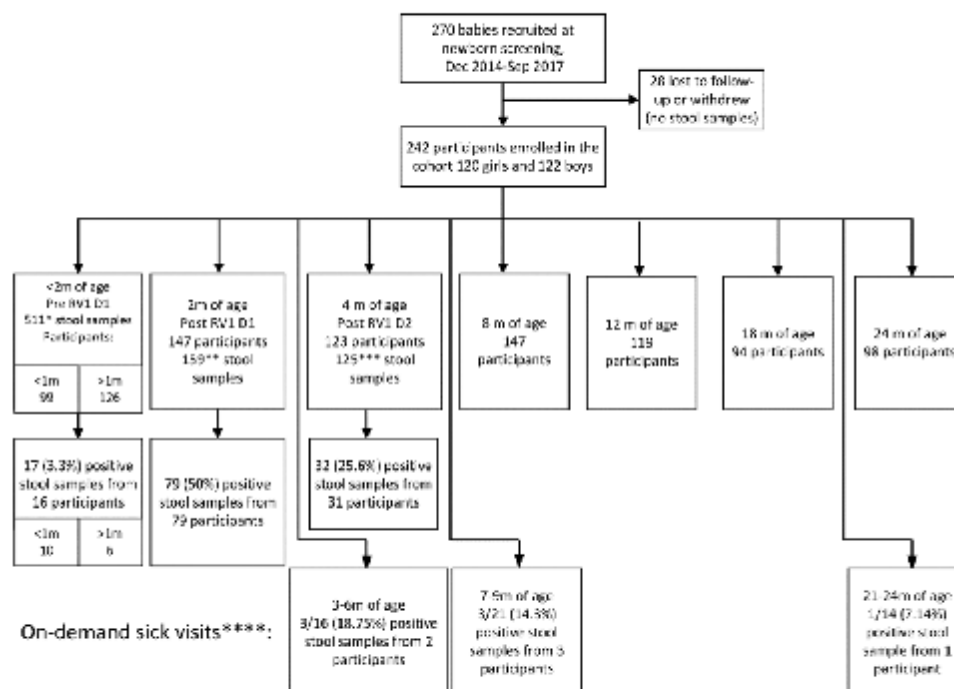


FIGURE 1. Flowchart for enrollment and monitoring the cohort participants.

TABLE 1. Sociodemographic Data From Study Participants

	N	%
Gender of the participants		
Female	120/242	49.6
Male	122/242	50.4
Monthly family income (Brazilian reais R\$)		
Up to 1 minimum wage (R\$ 1212)	128/223	57.4
Between 1–2 minimum wages (R\$ 1213–2424)	70/223	31.4
Between 2–3 minimum wages (R\$ 2424–3636)	18/223	8.1
Between 3–4 minimum wages (R\$ 3636–4848)	5/223	2.2
Above 5 minimum wages (R\$ 6060)	2/223	0.9
Maternal education		
Any elementary/middle school	88/223	39.5
Any high school	113/223	50.7
Any college	22/223	9.8
Type of residence		
Single-family home (brick construction)	183/223	82.1
Apartment building	39/223	17.5
Wooden shack	1/223	0.4
Connection to municipal water system		
Yes	217/223	97.3
No	6/223	2.7
Connection to municipal sewage system		
Yes	220/223	98.7
No	3/223	1.3

Nineteen participants were missing data on family income, maternal education, type of residence, connection to municipal water system, and connection to municipal sewer system.

has not yet been reported. This age group is the most susceptible to severe infection caused by wild rotavirus and there have been

ongoing efforts to develop a rotavirus neonatal vaccine.²⁸ In this cohort, the vaccine-derived G1P[8] strain was shed by neonates and infants, before the first dose of vaccine, as well as during the immunization cycle.

According to the literature,^{29–34} the introduction of rotaviruses vaccines has reduced the burden of diarrheal diseases caused by wildtype viruses. Similarly, we demonstrated that severe primary infection with wild rotavirus did not occur in infants from a low-resource community with high vaccine coverage, in the first 24 months of life. However, the prevalence of ADD in our population was even lower than that reported in low and middle-income countries.³⁵

More than 60% of infants from our cohort shed G1P[8] RV1 virus within the first week after the first and second doses. This is compatible with findings of randomized clinical trials, in which the vaccine-derived virus was shed in feces after both doses, with a higher rate of detection of the G1P[8] RV1 virus after the first dose.^{12,14,29,30,32,36}

No serious postvaccine adverse events such as anaphylaxis, intussusception, or bloody stool after two doses of RV1 were observed in this study. Although some study participants had fever after vaccination, this may have been due to other vaccines administered at the same time as RV1 including pentavalent (DTP/Haemophilus influenzae type b/Hepatitis B), anti-pneumococcal, and inactivated polio. No breakthrough infections with RVA were observed in the cohort. All seven ADD episodes attributed to RVA were mild and occurred in fully immunized children. There was only one case of acute gastroenteritis in which G1P[8] RV1 virus was detected. However, norovirus was also identified along with the vaccine-derived virus

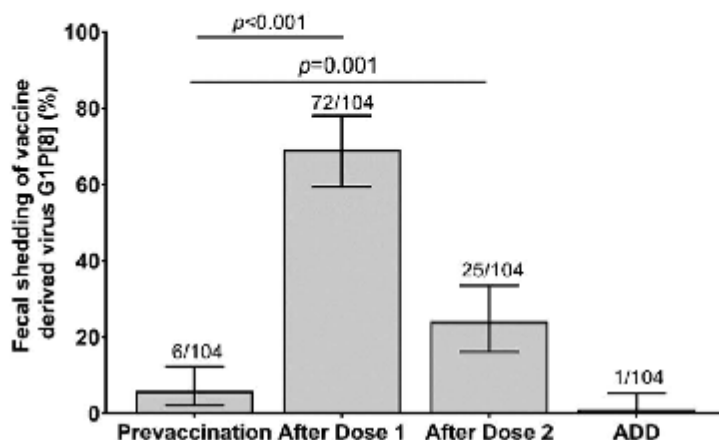


FIGURE 2. RV1 virus fecal shedding at different time points of the cohort.

strain, 56 days after the administration of the second dose of the vaccine, making it difficult to pinpoint the true cause of the ADD. With the drastic reduction in rotavirus circulation, norovirus has become one of the most frequent causes of gastroenteritis. Not surprisingly, in our study norovirus was more common than rotavirus as

the causative agent of ADD, as in studies from the Northern hemisphere.³⁷ A high diversity of norovirus genotypes circulated among our study participants, as previously described.³⁸

This study had strengths and weaknesses. Among the strengths was the longitudinal design in which we followed a birth cohort for two years in a low-resource community. Another strength was the identification of RVA through genotyping and other molecular methods using specific targets for confirmation of G1P[8] RV1 virus. Limitations included the loss to follow-up inherent in longitudinal studies,³⁹ which resulted in missed collection of stool samples. Such loss to follow-up was attributable in part to the social and economic vulnerability of the study participants who routinely experienced urban violence that made it difficult for some to attend study visits. Another weakness of the study was that not all rotavirus strains could be typed or sequenced. This is not unusual and may indicate either a low concentration of rotavirus in the stool or suboptimal stool collection. Nevertheless, this could have introduced a negative bias in our estimates of the frequency of G1P[8] RV1 virus. Lastly, it was a limitation that we did not collect data on the administration of RV1 to other household members near the time when unvaccinated neonates were shedding

TABLE 2. Postimmunization Adverse Events

	1st dose		2nd dose	
	N	%	N	%
Fever	77	38% (77/202)	63	31% (63/202)
Respiratory symptoms (cough, runny nose)	65	32% (65/202)	26	13% (26/202)
Diarrhea	30	14.8% (30/202)	26	13% (26/202)
Vomiting	10	5% (10/202)	10	5% (10/202)
Food refusal	5	2.5% (5/202)	2	1% (2/202)

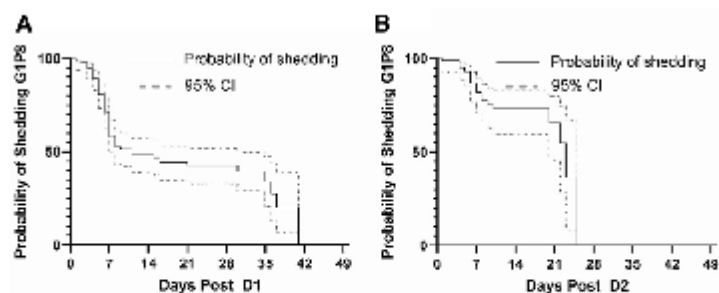


FIGURE 3. Percentage of children shedding RV1 virus by (A) days elapsed since the first dose (B) days elapsed since second dose.

vaccine viruses. We can conjecture that the high population density in this community and considerable vaccine coverage contributed to the exposure of these neonates to the vaccine-derived virus. Possible sources of transmission include other children in the household immunized against rotavirus or the mixing of children from different households at informal daycares, which are common in this community. To conclusively identify how these infants ingested vaccine strain virus studies specifically investigating this question would be necessary.

In conclusion, this study provides the first real-world evidence of fecal G1P[8] RV1 virus shedding by neonates and infants under six weeks of age in a resource-limited community. This population had no symptoms at the time of detection of vaccine-derived rotavirus strains and presented no ADD during the study period. Currently, guidelines do not recommend administering G1P[8] RV1 in neonatal and pediatric intensive care units, due to the concern that exposing infants less than 6 weeks of age to G1P[8] RV1 virus will result in adverse events. Although our results cannot be broadly generalized, they provide clinical evidence to support administering G1P[8] RV1 in such settings, because the study participants remained asymptomatic when shedding G1P[8] RV1 virus. Further studies in other settings will be needed to provide validation for such a recommendation.

REFERENCES

- Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2008;86:710-717.
- Kotloff KL. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64:799-814.
- Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396:1204-1222.
- Troeger C, Khalil IA, Rao PC, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhoea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr*. 2018;172:958-965.
- World Health Organization. Rotavirus vaccines: an update. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;34:533-537.
- World Health Organization. Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;38:49-64.
- World Health Organization. Rotavirus vaccines: WHO position paper - July 2021. *Wkly Epidemiol Rec*. 2021;96:301-320.
- Santos VS, Nóbrega FA, Soares MWS, et al. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before and after the National Rotavirus Vaccine Program: a review. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37:e63-e65.
- 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.
- Leshem E, Logman B, Glass R, et al. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:847-856.
- Steele AD, Neuzzi KM, Cunliffe NA, et al. Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis*. 2012;12:213.
- Roczko-Farkas S, Kirkwood CD, Cowley D, et al. The impact of rotavirus vaccines on genotype diversity: a comprehensive analysis of two decades of Australian surveillance data. *J Infect Dis*. 2018;218:546-554.
- Patel MM, Glass R, Desai R, et al. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis*. 2012;12:561-570.
- Phua KB, Quak SH, Lee BW, et al. Evaluation of RIX4414, a live, attenuated rotavirus vaccine, in a randomized, double-blind, placebo-controlled Phase 2 trial involving 2464 Singaporean infants. *J Infect Dis*. 2005;192(Supplement 1):S6-S16.
- Hsieh Y-C, Wu F-T, Hsiung CA, et al. Comparison of virus shedding after live attenuated and pentavalent reassortant rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2014;32:1199-1204.
- 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.
- Rivera L, Peña LM, Stainier I, et al. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain—a randomized, placebo-controlled study in twins. *Vaccine*. 2011;29:9508-9513.
- Bennett A, Pollock L, Jere KC, et al. Infrequent transmission of monovalent human rotavirus vaccine virus to household contacts of vaccinated infants in Malawi. *J Infect Dis*. 2019;219:1730-1734.
- Brazil P, Pereira JP, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375:2321-2334.
- Aliabadi N, Antoni S, Mwenda JM, et al. Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age, 2008-16: findings from the Global Rotavirus Surveillance Network. *Lancet Global Health*. 2019;7:e893-e903.
- Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006-2019. *J Infect Dis*. 2020;222:1731-1739.
- Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Mol Methods*. 2008;153:238-240.
- World Health Organization. *Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods*. WHO; 2009.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1998;41:95-98.
- Maes P, Matthijssens J, Rahman M, et al. A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol*. 2009;9:238.
- Gauram R, Erona MD, Mijatovic-Rustempasic S, et al. Real-time RT-PCR assays to differentiate wild-type group A rotavirus strains from Rotarix® and RotaTeq® vaccine strains in stool samples. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10:767-777.
- World Health Organization Epidemiological and Statistical Methodology Unit. *Sample Size Determination: A User's Manual*. World Health Organization; 1986.
- Al Thobari J, Damayanti W, Haposan JH, et al. Safety and immunogenicity of human neonatal RV3 rotavirus vaccine (Bio Farma) in adults, children, and neonates in Indonesia: Phase I Trial. *Vaccine*. 2021;39:4651-4658.
- do Carmo GMI, Yen C, Cortes J, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med*. 2011;8:e1001024.
- Aitchison CJ, Stowe J, Andrews N, et al. Rapid declines in age group-specific rotavirus infection and acute gastroenteritis among vaccinated and unvaccinated individuals within 1 Year of rotavirus vaccine introduction in England and Wales. *J Infect Dis*. 2015;213:243-249.
- Sabbe M, Berger N, Blommaert A, et al. Sustained low rotavirus activity and hospitalization rates in the post-vaccination era in Belgium, 2007 to 2014. *Euro Surveill*. 2016;21:30273.
- Bruun T, Salamanca BV, Bekkevold T, et al. Norwegian Enhanced Pediatric Immunisation Surveillance Network. Impact of the rotavirus vaccination program in Norway after four years with high coverage. *Pediatr Infect Dis J*. 2021;40:368-374.
- Macartney KK, Forwal M, Dalton D, et al. Decline in rotavirus hospitalisations following introduction of Australia's national rotavirus immunisation programme. *J Paediatr Child Health*. 2011;47:266-270.
- Leshem E, Tate JE, Steiner CA, et al. Acute gastroenteritis hospitalizations among US children following implementation of the rotavirus vaccine. *JAMA*. 2015;313:2282-2284.
- Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet (London, England)*. 2006;368:323-332.
- Anderson EJ. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:642-649.
- Becker-Dreps S, Bucardo F, Vilchez S, et al. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population-based study in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:1156-1163.
- Cantelli CP, Pumián TM, Malta FC, et al. Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2020;82:104280.
- Pedro RS, Carvalho MS, Giriamelli VR, et al. A population-based birth cohort study in a low-income urban area in Rio de Janeiro, Brazil: implementation and description of the characteristics of the study. *Cadernos de Saúde Pública*. 2019;35:e00023918.

**OPEN** Rotavirus A shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, 2014–2018

Carina Pacheco Cantelli^{1,2,3,4,5}, Alvaro Jorge Velloso¹, Rosane Maria Santos de Assis², José Júnior Barros¹, Francisco Campello do Amaral Mello⁴, Denise Cotrim da Cunha⁴, Patricia Brasil⁶, Johan Nordgren⁷, Lennart Svensson⁷, Marize Pereira Miagostovich^{2,3,5}, José Paulo Gagliardi Leite^{2,4} & Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{2,4}

Recent studies have investigated whether the human histo-blood group antigen (HBGAs) could affect the effectiveness of the oral rotavirus vaccines, suggesting secretor positive individuals develop a more robust response. We investigated the Rotavirus A (RVA) shedding in association with the host susceptibility profile in children from a birth community-cohort in Rio de Janeiro, Brazil, from 2014 to 2018. A total of 132 children were followed-up between 0 to 11-month-old, stool samples were collected before/after the 1st/2nd RV1 vaccination doses and saliva samples were collected during the study. RVA shedding was screened by RT-qPCR and G/P genotypes determined by multiplex RT-PCR and/or Sanger nucleotide sequencing. The sequencing indicated an F167L amino acid change in the RV1 VP8* P[8] in 20.5% of shedding follow-ups and these mutant subpopulations were quantified by pyrosequencing. The HBGA/secretor status was determined and 80.3% of the children were secretors. Twenty-one *FUT2* gene SNPs were identified and two new mutations were observed. The mutant F167L RV1 VP8* P[8] was detected significantly more in Le (a+b+) secretors (90.5%) compared to non-secretors and even to secretors Le (a-b+) (9.5%). The study highlights the probable association between RV1 shedding and HBGAs as a marker for evaluating vaccine strain host susceptibility.

After implementation of the rotavirus vaccines, Rotarix[®] (RV1, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) and RotaTeq[®] (RV5, Merck Inc., USA), in over 100 countries worldwide¹, the burden of severe group A rotaviruses (RVA) diarrhea has decreased substantially, with reductions in hospitalizations and deaths in many countries, including Brazil^{2–4}. However, RVA still are one of major causes of severe viral diarrhea in infants and young children <5-years-old worldwide^{4,7}. Due to the zoonotic potential, variability of the RVA strains and host genetic factors, the surveillance of circulating RVA strains is necessary for evaluating and monitoring the effectiveness of the implemented immunization programs, mainly in low-income countries⁸. Currently, 36 G- and 51 P- genotypes have been described⁹ and globally, six G/P combinations are the most prevalent in humans: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8], G4P[8] and G12P[8]¹⁰.

¹Immunobiological Technology Institute/Bio-Manguinhos, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ²Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ³Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Sérgio Arouca National School of Public Health, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ⁶Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ⁷Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, 581 85, Linköping, Sweden. ⁸These authors contributed equally: José Paulo Gagliardi Leite and Marcia Terezinha Baroni de Moraes. ⁹e-mail: carina.cantelli@ioc.fiocruz.br; manizepm@ioc.fiocruz.br

RV1 immunization period (age group)	n children (follow-up)	RVA detection rate (%)	RVA genotypes (ADE or non-ADE cases)	Secretor profile in RVA cases
Before the 1 st dose (<2 months)	127	11/304 (3.6)	5 G1P[8] and 3 RV1 G1P[8] (8 non-ADE)	8 Se
1 st and 2 nd doses (2–5 months)	125	92/234 (39.3)	G[NT]P[NT] (3 non-ADE)	3 Se
			6 G1P[8] and 78 RV1 G1P[8] (84 non-ADE) ^a	55 Se ^a and 12 Se ^a
			RV1 G1P[8] (2 ADE) and <u>F167L RV1 G1P[8] (1 ADE)</u>	2 Se and 1 se
			G12P[8] (1 ADE)	1 Se
			G3P[9] (1 ADE)	1 Se
After the 2 nd dose (6–11 months)	24	6/31 (19.4)	RV1 G1P[8] (1 ADE) and G3P[8] (1 ADE)	1 Se (same child)
			G12P[8] (1 ADE)	1 Se
			G[NT]P[8] (3 ADE)	3 Se
Total	132	109/569 (19.2)		

Table 1. Stool samples collected from the 132 infants/children in acute diarrheic episodes (ADE) or non-ADE, rotavirus A (RVA) detection rate and G- and P-genotyping (NT = not typed) in the different age groups. Distribution between RVA genotypes detected and the Secretor (Se: secretor, se: non-secretor) profile corresponding to 82 children followed. The birth community-cohort study was conducted between November 2014 and November 2018, in Rio de Janeiro, Brazil. ^aIn three children (5 G1P[8] cases), the secretor profile was considered inconclusive. ^bEight children with 2 RVA cases, ^cfour children with 2 RVA cases. F167L RV1 G1P[8] and RV1 G1P[8] and were characterized by Sanger sequencing, corresponding to the VP8* mutant gene for the F167L aa variation and the non-mutant, respectively. Cases of ADE with RV1 G1P[8] shedding are underlined.

Studies involving the histo-blood group antigens (HBGA) have shown the importance of the VP8* domain (subunit of the VP4 protein of RVA); in the early stages of the pathogenesis of RVA infection^{11–13} as well as identifying RV1 G1P[8] shedding by nucleotide sequencing^{14,15}.

HBGAs are complex glycans (type 1 H, Le^a, Le^b) present on cell surfaces and in biological fluids, such as blood, breast milk, saliva, and intestinal mucosa¹⁶. These glycans are catalyzed by glycosyltransferases, through sequential addition of monosaccharides to an initial precursor; these transferases are encoded by the *ABO*, *FUT2* (Secretor) and *FUT3* (Lewis) genes¹⁷. Secretor status is a host susceptibility factor in several infectious diseases, such as viral gastroenteritis by some RVA and noroviruses genotypes, and gastritis-ulcers by *H. pylori*¹⁸.

The HBGAs are highly polymorphic and differ across populations worldwide^{17,19}. The epistatic interaction between *FUT2* (Se) and *FUT3* (Le) genes determines the Lewis phenotype²⁰ and, principally, missense mutations in these genes interfere with the level of expression and activity of the $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase and $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase enzymes, determining 'non-secretor' and 'Lewis negative' Le (a–b–) phenotypes, respectively^{21–23}. The HBGA genes' mutations distributed worldwide as single nucleotide polymorphisms (SNPs) work as identity markers favoring certain conditions of susceptibility or resistance to infections or disorders.

In most studies on interaction between HBGAs and RVAs, the P[4] and P[8] VP8* genotypes preferentially infect the secretor and/or (Le^b) individuals²⁴; while non-secretor individuals (Le^a) were less susceptible to these genotypes^{25–27}. Recent studies have investigated whether the HBGA profile could contribute to the effectiveness of oral RVA vaccines^{28–33}, suggesting secretor positive individuals develop a more robust response^{28–30}.

This prospective study aimed to follow newborns up to <1-year of age in a low-income community-cohort in Manginhos, Rio de Janeiro, Brazil, vaccinated with RV1 between November 2014 and November 2018, in order to assess the G1P[8] vaccine shedding in association to HBGA profile.

Results

Sampling of the children from Manginhos community, Rio de Janeiro. The 132 children were followed for 16,212 child-days, ranging from 7–285 days, with 79% monitored up to at least 90 days. A total of 569 stool samples were collected and a median of five samples were obtained per child (no less than two samples/per child) and 132 saliva samples were obtained (1 sample/per child). Gender distribution was 50.8% (67) male and 49.2% (65) female.

Rotavirus A shedding. A total of 19.2% (109/569) of stool specimens were positive for RVA by one-step reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), corresponding to 62.1% (82/132) of all children enrolled in this prospective study. By age range analysis, the highest RVA detection rate (39.3%, 92/234) was observed in children aged between 2 and 5 months (vaccination period) (Table 1). RVA acute diarrheic episodes (ADE) and non-ADE cases corresponded to 26.8% (11/41) and 18.5% (98/528) of stool samples respectively, and the G1P[8] was the most prevalent genotype (88.1%, 96/109). The G12P[8] (1.8%, 2/109), G3P[8] (0.9%, 1/109), and G3P[9] (0.9%, 1/109) genotypes were also detected. Four samples (3.7%) were G- not typed (G[NT]P[8]) and five samples (4.6%) were G- and P-not typed (G[NT]P[NT]).

Through nucleotide analysis of the VP8* gene by sanger sequencing, the G1P[8] strains were characterized as RV1 G1P[8] shedding in 88.5% of stool samples (85/96), with a range of 99.6–100% and 99.5–100% for nucleotide (nt) and amino acid (aa) similarity with RV1, respectively. Additionally, 33% (28/85) of the samples characterized

Rotavirus A P[8] strains	amino acid position 167			
	Codon			
	1 st (nt 499)	2 nd (nt 500)	3 rd (nt 501)	aa
Wa-like (GenBank accession number: JX406750)	T	T	G	Leu
Prototype P1A[8] unpassaged 89-12	T	T	G	Leu
RV1 vaccine	T	T	T	Phe
RV1 shedding (this study)	T	T	T	Phe
	C	T	T	Leu
	T/C	T	A/T	Leu

Table 2. Nucleotide (nt) substitutions and corresponding 167 amino acid substitution (aa, Leu: leucine or Phe: phenylalanine) in the VP8* gene in different rotavirus A (RVA) strains: G1P[8] Wa-like, vaccine prototype, RV1 vaccine and RV1 G1P[8] shedding detected in the Manguinhos community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, from November 2014 to November 2018. The RV1 vaccine was used for VP8* Sanger sequencing and corresponds to the batch GlaxoSmithKline Biologicals Rixensart – Belgium, Human Rotavirus Live Attenuated RIX4414 strain – 1 dose, AROLB385A - Fab: February/2015 – Expiration date: January/2017.

as RV1-sourced G1P[8] were confirmed by Sanger sequencing of the VP7 (G1) and NSP4 genes presenting >99% of similarity (data not showed).

The RV1 G1P[8] in the analyzed strain was detected before the 1st dose (3 non-vaccinated cases) and from day 1 to day 58 (median of 7 days) post-vaccination (1st dose: 59 stool samples; 2nd dose: 23 stool samples), with the Ct value (RT-qPCR) varying from 19.6 to 40 (median Ct value 35.6, range from 1.6×10^9 to 2.4×10^5 genome copies/mL).

ADE was detected in two RV1 vaccinated children, one 2 and one 6-month-old (1st and 2nd doses, respectively), and in Sanger sequencing of the VP8* gene from both children's stool samples, RV1 G1P[8] shedding was detected. The RV1 G1P[8] recovered from the 2-month-old child's stool presented a VP8* P[8] mutation.

In relation to the other non-G1P[8] genotypes detected in this cohort in acute diarrheic episodes (ADE), the G3P[9] genotype was observed 11 days after the 1st dose of RV1 (RT-qPCR Ct value of 19) and G3P[8] was detected in one 6-month-old child (RT-qPCR Ct value of 32.5). The G12P[8] genotype was detected in one 4-month-old child (7 days after the RV1 2nd dose, RT-qPCR Ct value of 39.1) and one 10-month-old child (RT-qPCR Ct value of 36.4).

Detection of VP8* P[8] gene mutation. The F167L VP8* gene mutation in the RV1 G1P[8] characterized strains (F167L RV1 VP8* P[8]) was detected in 20.5% (27/132) of children monitored with shedding and was present in 23 children after the 1st dose, 2 children after the 2nd dose, 1 child before the 1st dose (persisting after the 1st dose, and 1 child before the 1st vaccine dose; see Supplementary Table S1). The F167L RV1 VP8* P[8] was detected from day 5 to day 31 (median of 8 days, except for 2 cases detected before the 1st dose), with a median RT-qPCR Ct value of 32.9. The RV1 G1P[8] shedding period (days post-vaccination) for children releasing these particles either with or without the F167L mutation was similar (median of 7 and 8 days).

Nucleotide analysis of the RV1 VP8* P[8] shedding by sanger sequencing showed a mutation at nt 499 T > C (1st position of the codon, T/CTT) in 26 samples (30.6%, 26/85), besides the mutation at nt 501 T > A (3rd position of the codon, T/CTA/T) in 2 samples (2.4%, 2/85), both positions resulting in the altered aa in position 167 in the VP4 protein (phenylalanine - Phe, substituted by leucine - Leu) (Table 2). Results obtained from pyrosequencing showed an allelic quantification of C/T for the 1st position and T/A for the 3rd position of the T/CTA/T codon, demonstrating a mixture of virus subpopulations containing Phe (TTT) and Leu (CTT, TTA or CTA) aa in RV1 G1P[8] characterized shedding. The stool samples varied from 1 to 95.5% (TTT) and 4.5% to 99% (CTT) in the 1st position (see Supplementary Fig. S1 and Table 1), 14 to 4% (CTA) and 86 to 96% (CTT), and 68 to 89% (TTA) and 32 to 11% (TTT) in the 3rd position. Besides that, two other aa substitutions were detected in the F167L RV1 VP8* P[8] shedding (in two stool samples): one (Y80H) in a conserved region and the other (N87S) in a hyper-variable region (antigenic site 8–4). Furthermore, one silent mutation was detected in the nt position 219 A > G (aa 73 T), in other sample.

HBGA phenotyping and FUT2 genotyping. Regarding the secretor status, 80.3% (106/132) of the children were classified as secretors and 15.9% (21/132) were non-secretors. Secretor status definition for 3.8% (5/132) of children was inconclusive. The Lewis phenotypes detected were: 59.8% (79/132) Le (a+b+), 15.9% (21/132) Le (a-b-), 13.6% (18/132) Le (a-b+), and 10.6% (14/132) Le (a+b-).

FUT2 genotyping was performed for 78 children with Le (a+b+) secretor and 21 with non-secretor status. Twenty-one SNPs were determined in 82.1% (64/78) of the Le (a+b+) secretor children and 17.9% (14/78) of them did not present any SNP. Twenty-eight genotypes were identified in Le (a+b+) secretors children (see Supplementary Table S2) and the most frequent genotype was Se ^{171A>G, 216C>T, 357T>C, 428G>A, 739G>A, 960A>G, 1000A>G, 1011T>C} (35.9%, 28/78). The rs281377 SNP (357 C > T) was detected in high frequency (80.7%, 63/78) and two new mutations were detected in the Le (a+b+) secretor phenotype (107 T > A and 257 C > T). Twelve SNPs were detected at a low frequency: rs1800021 (40 A > G), rs138507381 (212 T > C), rs200157007 (302 C > T), rs28362836 (315 C > A), rs1800026 (375 A > G), rs1800027 (480 C > T), rs1800025 (481 G > A), rs148371614 (544 G > A), rs142741127 (771 G > A), rs141630650 (855 A > C), rs916106939 (880 T > C), and rs144809245 (969 C > T). The

Secretor/Lewis profile	RV1 G1P[8] shedding ^a		F167L RV1 G1P[8] shedding ^b		P value ^{c,d}
	n = 40	(%)	n = 21	(%)	
Secretor	30	(75)	21	(100)	0.0433
Non-secretor	9	(22.5)	0	(0)	
Indetermined	1	(2.5)	0	(0)	
Le(a+b-)	6	(15)	0	(0)	0.0354
Le(a-b+)	5	(12.5)	2	(9.5)	
Le(a+b+)	23	(57.5)	19	(90.5)	
Le(a-b-)	6	(15)	0	(0)	

Table 3. Association between Secretor and Lewis profile and G1P[8] RV1 shedding (n = 61 children), without and with a F167L mutation, in the birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, from 2014 to 2018^a. The immunization schedule of the children with RV1 G1P[8] shedding: 28 after 1st dose, 12 after 2nd dose and 1 non-vaccinated child. ^bAll children were vaccinated with the 1st dose, except one (non-vaccinated). ^cTwelve children (with 2 RVA positive results each) were removed of the statistic analysis. ^dP values were determined by Chi-square test.

rs1047781 SNP (385 A > T) was not detected in any children phenotyped as Le (a+b+) in this cohort. Twelve (58.3%, 14/21)

children classified as non-secretor presented the following homozygous genotype: *se* (71A>G, 216C>T, 357T>C, 498G>A, 738G>A, 980A>G, 1008A>G, 1011T>C) (see Supplementary Table S3). In addition, one non-secretor child presented a new mutation (257 C > A) and the SNPs rs28362836 (315 C > T), rs138954645 (542 C > T), rs148571614 (544 G > A) and rs142741127 (771 G > A) were identified at a low frequency in three children, and were considered heterozygous at these positions (see Supplementary Table S3). One non-secretor child did not present any SNP in the *FUT2* gene.

Rotavirus A shedding and host susceptibility. Six genotypes in the *FUT2* gene were identified in 69.6% (16/23) of the Le (a+b+) secretor children with F167L RV1 VP8* P[8] shedding, and rs281377 (357 C > T) was present in 100% (16/16) of them. F167L RV1 VP8* P[8] shedding was more commonly detected in children with secretor status (p = 0.0433), and a Le (a+b+) phenotype (p = 0.0354) (Tables 3 and 4).

Other RVA genotypes isolated in ADE in this cohort were detected in the secretor children, these being G12P[8] in Le (a-b+) and Le (a+b+) and G3P[8] in Le (a+b+). The G3P[9] RVA was isolated from a child both Le (a-b-) and positive for fucose detection. A P[8] genotype, untypable for G[NT], was detected in three Le (a+b+) secretor children and in one secretor Le (a-b+) child. Untypable (G[NT]P[NT]) RVA cases were detected in Le (a+b+) secretors (four children) and in one non-secretor Le (a+b-) child.

Discussion

This prospective study focused mainly on assessing the RVA shedding in association to the HBGA profile in a birth community-cohort in Rio de Janeiro, Brazil. Through monitoring the RV1 G1P[8] shedding, it was possible to detect the F167L RV1 VP8* P[8] from stool samples of children from prior to the 1st dose and during the RV1 immunization period. The evaluation of these children's host susceptibility profile showed that secretor as well as Lewis b positive children were significantly more likely to shed RV1 G1P[8] with occurrence of the F167L VP8* mutation.

Via VP8* P[8] Sanger sequencing, 88.5% of the G1P[8] RVA detected were identified as RV1, mainly after the 1st dose (96.5%), at 2 months of age, similar to previously documented in clinical trials^{34–36}. The G1P[8] genotype was detected in eight non-vaccinated children (before the 1st dose) and due to the low viral load, only three cases could be sequenced and determined as RV1 G1P[8]. Despite the VP8* P[8] Sanger sequencing having been used to differ between RV1 and non-RV1 shedding^{34,35}, we should strictly consider the possibility of the RV1 G1P[8] shedding here characterized containing a RVA constellation differing from the source RV1. Therefore, this study shows the importance of characterizing the RV1 via the RVA constellation method before a vaccine batch can be used to produce RV1 doses.

The horizontal transmission of vaccine viruses has been previously demonstrated between vaccinated and unvaccinated infants or other close contacts^{35,36}. RV1 G1P[8] shedding was reported in two diarrhea cases after the 1st dose, with the F167L mutation being detected in one of them. In this study we observed a low diarrhea incidence, mainly in the first 4 months of age, which could be related to RV1 protection and the effect of exclusive breastfeeding (and transferred maternal antibodies) in these first months of life³⁷.

In the few diarrhea cases detected in this study, a rare G3P[9] was identified in one 2-month-old child after the 1st dose, with the VP8* P[9] gene exhibiting 97% nucleotide similarity to an *AU-1-like* Brazilian strain (KJ820906) collected from an inpatient 2-year-old, indicating a possible feline/canine-to-human interspecies transmission³⁸. The effectiveness of the RVA vaccines against genogroups 1 and 2 (*Wa-like* and *DS-1-like* strains, respectively) has been proven, but still remains unclear against the genogroup 3 (*AU-1-like*)^{39,40}. As to this rare genotype detected in Manguinhos, further studies are being conducted to determine the complete genomic constellation.

Through our molecular characterization of the RV1 G1P[8] shedding, it was possible to observe a high frequency of the mutation in the 167 position of the VP8* P[8] gene. In our study, only the VP8* domain was

Code Child	Immunization schedule	Days post-vaccine	RVA RT-qPCR Ct value	VP8* gene(Sanger sequencing)
004	3	NA	38,3	F167L RV1 G1P[8]
033	1	8	38,5	F167L RV1 G1P[8]
037	1	8	39,5	RV1 G1P[8]
043	1	5	34,1	F167L RV1 G1P[8]
053	1	5	39,7	RV1 G1P[8]
057	1	8	34,9	F167L RV1 G1P[8]
071	2	5	33,7	RV1 G1P[8]
072	2	5	30,3	RV1 G1P[8]
090	1	10	33,1	F167L RV1 G1P[8]
094	1	9	31,6	F167L RV1 G1P[8]
096	1	6	36,6	RV1 G1P[8]
097	1	8	37,2	RV1 G1P[8]
099	1	16	38,1	RV1 G1P[8]
101	1	8	34,1	F167L RV1 G1P[8]
113	1	7	28,4	F167L RV1 G1P[8]
122	1	7	35,8	RV1 G1P[8]
122	2	7	37,5	F167L RV1 G1P[8]
142	1	17	36,7	F167L RV1 G1P[8]
144	1	12	26,3	F167L RV1 G1P[8]
160	1	12	33,9	F167L RV1 G1P[8]
164	2	7	36,7	RV1 G1P[8]
173	2	9	35,4	RV1 G1P[8]
204	1	8	38,0	RV1 G1P[8]
211	1	8	32,8	F167L RV1 G1P[8]
225	1	7	23,3	F167L RV1 G1P[8]
226	2	8	37,7	RV1 G1P[8]
233	1	8	37,2	RV1 G1P[8]
234	1	5	24,5	F167L RV1 G1P[8]
234	2	9	35,4	RV1 G1P[8]
235	1	8	21,9	F167L RV1 G1P[8]
236	1	8	19,8	F167L RV1 G1P[8]
240	1	9	39,6	F167L RV1 G1P[8]
244	1	8	19,6	F167L RV1 G1P[8]
245	1	6	21,6	RV1 G1P[8]
249	2	5	34,5	RV1 G1P[8]
250	1	6	22,6	RV1 G1P[8]
253	1	22	30,0	F167L RV1 G1P[8]
259	1	6	26,5	F167L RV1 G1P[8]
259	2	7	30,7	RV1 G1P[8]
261	1	7	22,7	RV1 G1P[8]
261	2	24	36,1	RV1 G1P[8]
264	1	5	27,1	RV1 G1P[8]
265	2	58	38,6	RV1 G1P[8]
266	2	10	33,7	RV1 G1P[8]
270	3	NA	21,0	F167L RV1 G1P[8]
270	1	31	32,9	F167L RV1 G1P[8]
275	1	6	20,3	RV1 G1P[8]
281	1	6	19,9	F167L RV1 G1P[8]
282	1	3	32,0	RV1 G1P[8]
284	1	4	26,6	RV1 G1P[8]
292	1	4	22,9	RV1 G1P[8]
293	1	5	35,9	RV1 G1P[8]

Table 4. Detection of the RV1 G1P[8] shedding, with or without a F167L mutation, in children phenotyped as Le (a+b+) secretors (n = 47) in the birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, from 2014 to 2018. G1P[8] RVA samples were firstly genotyped by G/P multiplex RT-PCR. The VP8* gene was analyzed by sanger nucleotide sequencing. Information about these derived vaccine samples are summarized: the immunization schedule (1: 1st dose, 2: 2nd dose, 3: non-vaccinated), number of days of vaccine shedding (NA: not applicable,?: no information) and Rotavirus (RVA) RT-qPCR Ct value.

analyzed because it is directly related to interactions with HBGAs. In the previous studies with the G1P1A[8] rotavirus vaccine candidate 89-12, the precursor to RV1, Ward *et al.*⁴³ identified five aa changes in the VP4 gene (G51D and L167F in VP8* domain; D331Y, D385Y and N695I in VP5* domain) that occurred during vaccine attenuation. It was proposed that these alterations could reduce cross neutralizing antibody responses. Indeed, according to Gozalbo-Rovira *et al.*⁴³, the 167 position is placed at the bottom of the sugar-binding pocket, and Phe residue contained in RV1 G1P[8] could influence the interaction between the vaccine strain and the sugar of the cellular receptor, due to hydrophobic residue decreasing the binding affinity. 32.9% of the RV1 G1P[8] shedding samples detected in this birth-cohort presented the mutation in the 167 position, with a mixture of virus subpopulations of both amino acids, Leu (CTT, TTA, CTA) and Phe (TTT), in different percentages. We could hypothesize that this suggest an initial process of reversion of attenuation or a selective pressure, through the one and/or two alteration(s) in this codon (positions nt 499, 501), favoring the highest amount of circulation of strains containing the Leu residue, which has a greater avidity for the HBGAs binding site in the secretor profile. Zeller *et al.*⁴³ also reported the mutation in position 167 in the 3rd position of the codon (nt 501), in one vaccine derived strain (BE00048) detected in Belgium, in 2009.

Positive secretor status was the most prevalent (80.3%) in this community-cohort, and the Le (a+b+) profile (59.8%) frequency was similar to that observed in younger children from the Amazon (58.8%) as presented in our previous study⁴⁴. The rs1047781 (385 A > T) SNP, responsible for the weak genotype in the Asian population, was not detected in Le (a+b+) children in the Manguinhos community, Rio de Janeiro state. The rs281377 (357 C > T), a synonymous mutation, was the most frequent SNP detected in this Le (a+b+) secretor profile, and this SNP has been detected in the Brazilian population^{44,45}. According to Ferrer-Admella *et al.*¹⁹, the rs281377 (357 C > T) SNP has been detected in a worldwide distribution profile in the natural population, and the *se*^{357/385} haplotype is frequently detected in the Asian population. We could explain the high frequency of the Le (a+b+) phenotype detected in children in Rio de Janeiro, Brazil under an evolutionary view that, at some point in the molecular clock, the *se*^{357/385} haplotype had diverged and separated from the rs1047781 (385 A > T) SNP. However, epistatic interactions between rs281377 (357 C > T) and other SNPs could affect the expression of the *FUT2* gene. The failure in detecting the rs1047781 (385 A > T) SNP, which has been attributed as responsible for the weak secretor phenotype detected in Le (a+b+), in the children in the Manguinhos community in the state of Rio de Janeiro could be explained by the presence of new SNPs in conjunction with rs281377 (357 C > T). Further studies encompassing larger populations, including Le (a-b+) secretors will be needed to evaluate whether particular SNPs in *FUT2* gene can explain the phenotypes Le (a+b+) vs Le (a-b+) (or similar).

Our study identified SNPs in the *FUT2* gene in children from the Manguinhos community, in Rio de Janeiro as rs1800021 (40 A > G), rs48703160 (171 A > G), rs681343 (216 C > T), rs281377 (357 T > C), rs601338 (428 G > A), rs602662 (739 G > A) and rs485186 (960 A > G), also reported by Vicentini *et al.*⁴⁶ in children from a Quilombola community (black population, slave descendants) in Espírito Santo (borders with the state of Rio de Janeiro, both states in Southeastern Brazil).

The Brazilian population has a high ethnic diversity and through this study in the Manguinhos children community-cohort, it was possible identify two new mutations: 107 T > A and 257 C > T/A and other SNPs, at a low frequency, not yet reported in Brazil: rs138507381 (212 T > C), rs200157007 (302 C > T), rs28362836 (315 C > A/T), rs1800026 (375 A > G), rs1800025 (481 G > A), rs138954645 (542 C > T), rs148371614 (544 G > A), rs142741127 (771 G > A), rs141630650 (855 A > C), rs916106939 (880 T > C), and rs144809245 (969 C > T).

Le (a+b+) phenotype is very common in infants and children under 2 years-old, usually being a transient status in most children⁴⁶. In the infancy period, the Lewis phenotypes have not yet fully matured⁴⁷, due to the activity of the fucosyltransferases (*FUT2* and *FUT3* genes) not yet reaching the normal levels (enzyme activity of *Le > Se*)²⁰.

In relation to the non-secretor phenotype, a unique child (0Le (a-b-)) did not present any SNP in the *FUT2* gene, i.e., not showing the nonfunctional allele *se*⁶⁰⁰ (rs601338)²¹. This child shed the RV1 G1P[8] strain virus in both doses (6 days post-1st dose; 7 days post-2nd dose); however, only in the 2nd dose was the F167L mutation detected, with mixed virus subpopulations of 63.5% Phe/36.5% Leu. Possibly, other genetic factors could be related to this profile and vaccinal response.

The P[9] RVA genotype interacts with A-type HBGA antigen⁴⁸, and the ABO enzyme assay was performed in a saliva sample from the unique child that was infected with this genotype (G3P[9]) in this cohort, presenting positivity for type A antigen (ALe (a-b-) secretor) (data not shown), thus in line with the proposed susceptibility of A to genotype P[9].

The Manguinhos cohort showed a high prevalence of secretors, being a common profile in Latin America^{30,31,44,45,49}. In this study, we were able to investigate RVA shedding and a common mutation was identified in many samples characterized as RV1 according to VP8* Sanger sequencing criteria. This mutational event suggests that the vaccine could be replicating and therefore a more robust immune response may be produced in these infants. In summary, our study demonstrated that Le (a+b+) secretors can influence vaccine replication.

This study highlights the detection of the new mutations in the *FUT2* gene detected in the community of Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil and the association between vaccine strain shedding and HBGAs as a marker for evaluating vaccine efficiency. The results in this study indicate the importance of the full molecular monitoring of the RV1 vaccine virus stool shedding, mainly if the F167L VP8* mutation is frequent in other populations, and how the host susceptibility profile can influence this viral selective pressure, besides the questions about circulation and fluctuations of the emergent RVA genotypes and ensuring vaccine efficacy in a post-RVA vaccine era.

Material and methods

Study design, clinical specimens and Ethics Statement. This is a prospective cohort study that aims to perform acute gastroenteritis surveillance in the Mangueiros community, Rio de Janeiro, Brazil, which has one of the lowest Human Development Indexes (HDI) of the municipality⁵¹. This project has been approved by the Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (CEP 688.566/14). Written informed consent was obtained from each child's parent or legal guardian. The RV1 vaccine was the one received by all vaccinated newborn infants enrolled in this study (2-dose series at ages 2 and 4 months and with a minimum interval between doses of 4 weeks). The vaccination card of each child was verified. A vaccination inquiry was performed at Germano Simval Faria Health Center (GSFHC) by a pediatrician who accompanied this study, questioning each child's parent or guardians as to vaccination for RVA (double-checking).

A flow diagram including the participants and the specific steps of methods applied in this study are presented in Supplementary Fig. S2. All clinical specimens were sent to the Regional Rotavirus Reference Laboratory/Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LCEV) and kept at -20°C , until the moment of processing and further analysis. The methods were performed in accordance with guidelines and regulations.

RNA extraction from fecal specimens and viral RVA detection. Viral RNA was extracted from clarified stool specimens (10–20% w/v) using an automatic RNA extraction procedure according to the manufacturer's instructions (QIAcube[®] Automated System and QIAamp[®] Viral RNA Mini kit; Qiagen, CA, USA). RVA detection was performed using RT-qPCR on an Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described⁵¹. The RVA RT-qPCR result was considered positive if the cycle threshold (Ct) value was ≤ 40 .

G- and P- RVA genotyping. Semi-nested multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed for G- and P- RVA genotyping using SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and 9con1L/VP7deg (VP7) and 4con3/4con2 (VP8*) primers to generate 904-base-pair (bp) and 876-bp fragments, respectively. These amplicons were used as a template in a second round of amplification with genotype-specific primers as described on WHO/IVB/08.17⁵². In parallel with the amplicons obtained from child stool samples, the batch named RV1 vaccine identified as GlaxoSmithKline Biologicals Rixensart – Belgium, Human Rotavirus Live Attenuated RIX4414 strain – 1 dose, AROLB385A – Fab: February/2015 – Expiration date: January/2017, was used for RNA extraction and VP8* gene amplification using the same 4con3/4con2 (VP8*) primers cited above.

VP8* RVA molecular characterization. Products of one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using 4con3/4con2 (876-pb) were purified using Wizard[®] SV Gel and a PCR Clean-Up System kit (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's instructions. The purified amplicons of the VP8* gene of RVA were analyzed by Sanger sequencing using a BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the ABI Prism 3730 or 3500 Genetic Analyser[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Chromatograms were analyzed and nt sequences (consensus) were edited using the BioEdit 7.2.1 Sequence Alignment Editor⁵³ and nt similarity was assessed using the Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). RVA genotypes were assigned using the RotaC²⁰ automated genotyping tool for Group A rotaviruses (<https://rotac.regatools.be/>)⁵⁴. Deduced aa sequences of VP8* (G1P[8]) were aligned and compared with the RV1 (JX943612), RV1 vaccine and G1P[8] Wa-like (JX406750) strains, and nt and aa similarities values between RV1 and G1P[8] strains were verified using the BioEdit 7.2.1 Sequence Alignment Editor⁵³. The representative gene sequences of VP8* RVA obtained in the current study were submitted to GenBank under the accession numbers MN366044–MN366074. Pyrosequencing for mutation analysis of RV1 VP8* P[8] shedding. A pyrosequencing assay was performed using PyroMark Q96 ID (QIAGEN Valencia, CA, USA). The following primers were designed to amplify a 203-bp fragment of the VP8* P[8] subdomain containing the target (cytosine or thymine/nt 499, and adenine or thymine/nt 501): forward (VP8*RV1F) 5'-AGCAATTTAATGTGAGTAACGA-3' (nt 346–368) and reverse (VP8*RV1R) 5'-BIOTIN-AAATTTGCAGTACTTGAACCTGTCA-3' (nt 548–525) using PyroMark[®] Assay Design 2.0 software (QIAGEN Valencia, CA, USA). The forward (VP8*RV1-S1) (5'-TGATACCAGACTTGTAGGA-3'; nt 447–465) was designed for the pyrosequencing assay. The biotinylated fragment (203-pb) was amplified using SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Initially, the samples were denatured with primers at $97^{\circ}\text{C}/7$ min. Next, the master mix was added in each tube, and incubated under the following thermocycling conditions: cDNA synthesis and pre-denaturation at $50^{\circ}\text{C}/30$ min, denaturation at $94^{\circ}\text{C}/10$ min, then 40 cycles of $94^{\circ}\text{C}/15$ s, $53^{\circ}\text{C}/30$ s and $68^{\circ}\text{C}/1$ min, followed by a final elongation step ($68^{\circ}\text{C}/5$ min). Each sample and controls (positive and negative) were tested in duplicate and the quality of the RT-PCR products were checked by agarose gel electrophoresis. Biotinylated amplicons were hybridized to streptavidin-coated beads and purified using the PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Pyrosequencing reactions were performed using the PyroMark Gold Q96 SQA Reagents in the PyroMark Q96 ID (QIAGEN) following the manufacturer's instructions, and the analysis of the peaks was performed using PyroMark ID software. The allelic quantification results (%) were calculated by the duplicate media. The primers designed for this analysis and thermocycling conditions were previously tested and validated. As a positive control, a fragment of the VP8* P[8] region (encoding aa 7–257) of the RV1 stool shedding was isolated. The fragment without the mutation (nt 499/T) was ligated into the pCR[®]4-TOPO[®] vector using the TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies, UK) and then transformed into competent *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen, Life Technologies, UK) following the classical methodologies previously described⁵⁵.

HBGA phenotyping and secretor status in saliva. The saliva samples were collected using sterile cotton-swabs (CHEMBIO[®], Medford, NY, USA). Two enzyme immunoassays (EIA) were performed, as described previously^{44,46}, to detect ABO (H) histo-blood groups and Lewis phenotypes, and specifically define the secretor status of Le (a–b–) saliva samples (using *Ulex europaeus* lectin).

DNA extraction from saliva and FUT2 genotyping. Genomic DNA recovered from epithelial cells was extracted from each saliva sample collected from children phenotyped as Le (a+b+) secretor and non-secretor Le (a+b–) or Le (a–b–) and were used in the touchdown PCR for the genotyping of SNPs in the *FUT2* gene, by Sanger sequencing as previously described^{44,47}.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 v.8.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Detection of the G1P[8] RVA genotype (RV1 stool shedding) in association with the host susceptibility profile was investigated, when appropriate, through the Chi-square or Fisher's exact test, with a significance level of 5.0%.

Received: 5 November 2019; Accepted: 19 March 2020;

Published online: 21 April 2020

References

1. ROTA Council. Global introduction status. <http://rotacouncil.org/vaccine-introduction/global-introduction-status/> (2019).
2. do Carmo, G. M. I. et al. Decline in Diarrhea Mortality and Admissions after Routine Childhood Rotavirus Immunization in Brazil: A Time-Series Analysis. *PLoS Med.* **8**, e1001024 (2011).
3. Desai, R. et al. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 907–911 (2011).
4. Lanzieri, T. M. et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* **15**, e2016–e210 (2011).
5. de Oliveira, L. H., Camacho, L. A., Coutinho, E. S., Rutz-Matus, C. & Lettice, J. P. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* **1**, A248–254 (2015).
6. Troeger, C. et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr.* **172**, 958–965 (2018).
7. Bányai, K., Estes, M. K., Mariella, V. & Parashar, U. D. Viral gastroenteritis. *Lancet* **392**, 175–186 (2018).
8. Patton, J. T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov. Med.* **13**, 85–97 (2012).
9. Rotavirus Classification Working Group. <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg> (2018).
10. Dóro, R. et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* **28**, 446–461 (2014).
11. Liu, Y. et al. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J. Virol.* **86**, 9899–9910 (2012).
12. Huang, P. et al. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* **86**, 4833–4843 (2012).
13. Sun, X. et al. Binding specificity of P[8] VP8* proteins of rotavirus vaccine strains with histo-blood group antigens. *Virology* **495**, 129–135 (2016).
14. Mokomane, M. et al. Diversity of Rotavirus Strains Circulating in Botswana before and after introduction of the Monovalent Rotavirus Vaccine. *Vaccine* **37**, 6324–6328 (2019).
15. Gautam, R. & Bowen, M. D. One-step Quantitative RT-PCR Assays for Detecting, Genotyping and Differentiating Wild-Type Group A Rotaviruses and Vaccine (Rotarix[®] and RotaTeq[®]) Strains in Stool Samples. *J. Vaccines Vaccin.* **7**, 341 (2016).
16. Daniels, G. Human Blood Groups (3rd ed. Blackwell) (London, 2013).
17. Marionneau, S. et al. ABO and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* **83**, 565–573 (2001).
18. Heggelund, J. E., Varrot, A., Imbert, A. & Krengel, U. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44**, 190–200 (2017).
19. Ferrer-Admetlla, A. et al. A natural history of FUT2 polymorphism in humans. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1993–2003 (2009).
20. Henry, S., Oriol, R. & Samuelsson, B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang.* **69**, 166–182 (1995).
21. Kelly, R. J., Rouquier, S., Glorj, D., Lennon, G. G. & Lowe, J. B. 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 (1995).
22. Koda, Y., Soejima, M. & Kimura, H. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg. Med.* **3**, 2–14 (2001).
23. Le Pendu J. Histo-Blood Group Antigen and Human Milk Oligosaccharides. In: Pickering L. K., Morrow A.L., Rutz-Palacios G. M., Schanler R.J. (eds.) *Protecting Infants through Human Milk*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 554. Springer (Boston, MA, 2004).
24. Cooling, L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 801–870 (2015).
25. Kambhampati, A., Payne, D. C., Costantini, V. & Lopman, B. A. Host genetic susceptibility to enteric viruses: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 11–18 (2016).
26. Sun, X. et al. Rotavirus infection and histo-blood group antigens in the children hospitalized with diarrhoea in China. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 740.e1–3 (2016).
27. Yang, T., Hou, J., Huang, Y. & Chen, C. Genetic susceptibility to Rotavirus Gastroenteritis in Taiwanese Children. *Sci. Rep.* **7**, 6412 (2017).
28. Kazi, A. M. et al. Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. *J. Infect. Dis.* **215**, 786–789 (2017).
29. Armah, G. E. et al. Rotavirus vaccine take in infants is associated with secretor status. *J. Infect. Dis.* **219**, 746–749 (2019).
30. Bucardo, E. et al. Histo-blood group antigens and rotavirus vaccine shedding in Nicaraguan Infants. *Sci. Rep.* **9**, 10764 (2019).
31. Bucardo, E. et al. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Sci. Rep.* **8**, 1502 (2018).
32. Pollock L., et al. Non-secretor histo-blood group antigen phenotype is associated with reduced risk of clinical rotavirus vaccine failure in Malawian infants. *Clin Infect Dis.* **cjy1067** (2018).
33. Lee, B. et al. Histo-Blood Group Antigen Phenotype Determines Susceptibility to Genotype-Specific Rotavirus Infections and Impacts Measures of Rotavirus Vaccine Efficacy. *J. Infect. Dis.* **217**, 1399–1407 (2018).

34. Phua, K. B. *et al.* Evaluation of RIX4414, A Live, Attenuated Rotavirus Vaccine, in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Trial Involving 2464 Singaporean Infants. *J. Infect. Dis.* **192**, 56–516 (2005).
35. Anderson, E. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 642–649 (2008).
36. Rivera, L. *et al.* Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain - A randomized, placebo-controlled study in twins. *Vaccine* **29**, 9508–9513 (2011).
37. Turin, C. G. & Ochoa, T. J. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World. *Curr. Trop. Med. Rep.* **1**, 97–105 (2014).
38. Tsugawa, T., Raimwater-Lovett, K. & Tsutsumi, H. Human G3P[9] rotavirus strains possessing an identical genotype constellation to AU-1 isolated at high prevalence in Brazil, 1997–1999. *J. Gen. Virol.* **96**, 590–600 (2015).
39. Braeckman, T. *et al.* Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: case-control study. *BMJ* **345**, e4752 (2012).
40. Payne, D. C. *et al.* Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children, 5 years of age, 2009–2011. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 13–20 (2013).
41. Ward, R. L. *et al.* Reductions in Cross-Neutralizing Antibody Responses in Infants after Attenuation of the Human Rotavirus Vaccine Candidate 89-12. *J. Infect. Dis.* **194**, 1729–1736 (2006).
42. Gosalbo-Rovira, R. *et al.* Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. *PLoS Pathog.* **15**, e1007865 (2019).
43. Zeller, M. *et al.* Comparative analysis of the Rotarix™ vaccine strain and G1P[8] rotaviruses detected before and after vaccine introduction in Belgium. *PeerJ* **5**, e2733 (2017).
44. Moraes, M. T. B. *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.* **70**, 61–66 (2019).
45. Vicentini, F. *et al.* Molecular Characterization of Noroviruses and HBGA from Infected Quilombola Children in Espírito Santo State, Brazil. *PLoS ONE* **8**, e69348 (2013).
46. Cooling L., Down T. *Immunohematology*. In McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods (22nd ed. Elsevier Saunders) 674–730 (Philadelphia, PA, 2011).
47. Molhan, I. Lewis phenotypes of American Caucasians, American Negroes and their children. *Vox Sang.* **39**, 327–330 (1980).
48. Hu, L. *et al.* Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* **485**, 256–259 (2012).
49. Lopman, B. A. *et al.* Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. *J. Infect. Dis.* **211**, 1813–1821 (2015).
50. Pedro, R. S. *et al.* A population-based birth cohort study in a low-income urban area in Rio de Janeiro, Brazil: implementation and description of the characteristics of the study. *Cad. Saúde Pública* **35**, e00023918 (2019).
51. Zeng, S. Q. *et al.* One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. M.* **153**, 238–240 (2008).
52. WHO. Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods, https://apps.who.int/tris/bitstream/handle/10665/70122/WHO_IVB_08.17_eng.pdf?sequence=1&tsAllowed=y (2019).
53. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999).
54. Maes, P., Matthijssens, J., Rahman, M. & Van Ranst, M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* **9**, 238 (2009).
55. Sambrook J. & Russel D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press (2001).
56. Nordgren, I. *et al.* Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 1567–1573 (2014).
57. Elmgren, A., Börjesson, 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.* **70**, 97–103 (1996).

Acknowledgements

We would like to thank the parents and infants who participated in this study. We would like to thank Miriã Alves Gonçalves Trindade for her help with the collection of specimens and clinical data, and Messias da Silva, Sérgio da Silva e Mouta Junior, Alexandre Madi Fialho, Fábio Correia Malta, Yan Cardoso Pimenta and Leticia Campos for the laboratorial support. We would like to thank the staff members of “the FIOCRUZ Institutional Platform for DNA sequencing (PDTIS)” and of “the Quality Control of the Bio-Manguinhos (DEQUA)” for technical support including the batch of rotavirus vaccine (RV1) supplied. Special thanks to Bruno Baroni de Moraes e Souza for the English revision of this manuscript. This study was funded by “The Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz/PAEP”, “The Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro” (PAPERJ E-26/202.968/2015) and “The National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq 424376/2016-4), “Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel -CAPES”- PPrint-Fiocruz-CAPES and “PROGRAMA DE PROFESSOR VISITANTE NO EXTERIOR (88881.337140/2019-01)”. M.P.M. and J.P.G.L. are researchers at the “Scientist from Our State” (CNE/PAPERJ).

Author contributions

C.P.C., M.P.M., J.P.G.L. and M.T.B.M., proposed the study and designed the experiments. D.C.C. and P.B., designed the clinical study, collected the samples and followed-up on the children. C.P.C., A.J.V., R.M.S.A., F.C.A.M. and J.J.F.B., performed laboratory experiments and analysis. C.P.C., M.P.M., J.P.G.L. and M.T.B.M., interpreted the data and wrote the manuscript. J.N. and L.S., discussed the results and critically reviewed the final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64025-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.P.C. or M.P.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

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

Research Paper

Norovirus infection and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil



Carina Pacheco Cantelli^{a,b,*}, Tulio Machado Fumian^b, Fábio Correia Malta^b,
Denise Cotrim da Cunha^c, Patricia Brasil^d, Johan Nordgren^e, Lennart Svensson^e,
Martze Pereira Mlagostovich^b, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{b,1},
José Paulo Gagliardi Leite^{b,1}

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

^b Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil

^c Sérgio Arouca Public Health National School, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil

^d Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Norovirus
GII.4 Sydney
Susceptibility
Secretor
Lewis
Birth community-cohort

ABSTRACT

Norovirus has emerged as an important viral agent of acute pediatric gastroenteritis, with a growing genetic diversity reported in the last decades. Histo-blood group antigens (HBGAs) present on the surface of enterocytes are susceptibility factors for norovirus infection and differ between populations which could affect the epidemiology and evolution of these viruses. This study investigated the frequency, incidence and genetic diversity of noroviruses in a cohort of rotavirus A vaccinated children in association to the host HBGA (Secretor/Lewis) genetic susceptibility profile. Norovirus genogroups I and II (GI/GII) were screened by RT-qPCR in 569 stool samples from 132 children followed-up from birth to 11 months of age during 2014–2018. Noroviruses were identified in 21.2% of children enrolled in this study, with a norovirus detection rate of 5.6% (32/569), in 17.1% and 4.7% of acute diarrhetic episodes (ADE) and non-ADE, respectively. The norovirus incidence was 5.8 infections per 100 child-months. Partial nucleotide sequencing characterized six different norovirus genotypes, with GII.4 Sydney 2012 being detected in 50% associated with three different polymerase genotypes (GII-P31, GII-P16 and GII-P4 New Orleans 2009). FUT3 genotyping was yielded seven new mutations in this population. A significant association between symptomatic norovirus infection and secretor profile could be inferred.

1. Introduction

Noroviruses have emerged as a leading cause of viral of acute pediatric gastroenteritis worldwide, especially after the rotavirus A (RVA) vaccines implementation (Koo et al., 2013), as well as the widespread use of sensitive molecular methods to detect norovirus in global surveillance (Glass et al., 2000; van Beek et al., 2018). Nowadays, noroviruses are associated with 18% of all cases in <5-year-old, and an estimated 212,000 deaths annually (Ahmed et al., 2014; Fiers et al., 2015).

Noroviruses are genetically diverse positive-stranded RNA viruses that belong to the genus *Norovirus* within the *Caliciviridae* family (Green, 2013). The genogroups I and II (GI and GII) are the most

common in human disease; and the accumulation of point mutations and recombination drives the evolution of norovirus genotypes (Kroneman et al., 2013). The binary typing system involving both polymerase and capsid sequences (RdRp = P type and VP1 = capsid genotype) (Kroneman et al., 2013) has been used for molecular characterization and currently 60 P-types and 49 capsid genotypes have been described (Chhabra et al., 2019).

Noroviruses belonging to GII.4 genotype have been the most prevalent viruses circulating in the last two decades in epidemic and sporadic acute gastroenteritis cases in Brazil (Fioretti et al., 2014; Fumian et al., 2016; Costa et al., 2017) and worldwide (Siebenga et al., 2009; Hoa Tran et al., 2013; Vinjé, 2015; Cannon et al., 2017). On average, every 2 to 7 years new GII.4 variants arise, and since 2012

* Corresponding author at: Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz, Av. Brasil, 4365 - Pav. Hélio & Peggy Perim, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: carina.cantelli@gmail.com, carina.cantelli@bto.fiocruz.br (C.P. Cantelli).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104280>

Received 26 December 2019; Received in revised form 4 March 2020; Accepted 7 March 2020

Available online 09 March 2020

1567-1348/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

GIL4 Sydney has been the dominant variant (Siebenga et al., 2007; Kroneman et al., 2013), although other emergent genotypes (GII.17 and GII.2) have emerged locally, especially in Asian countries in the last years (Tohma et al., 2017; Sang and Yang, 2018). Currently there is no licensed norovirus vaccine, albeit some candidates are under development. Among them, the phase IIb trials of the bivalent GII.1/GII.4 (nonreplicating virus-like particle/VLP) prototype are ongoing (Mattison et al., 2018).

Previous studies have shown that susceptibility to norovirus infections can differ among individuals (Ländesmith et al., 2003; Huang et al., 2005; Thorven et al., 2005). Norovirus strains recognize the histo-blood group antigens (HBGAs) present on the surface of enterocytes through the P2 subdomain of VP1 (Hutson et al., 2003). The HBGAs are polymorphic and vary between different populations (Marionneau et al., 2001) and the binding specificity and host susceptibility of norovirus differ between genogroups and genotypes (Huang et al., 2005), affecting norovirus molecular epidemiology and evolution worldwide (Nordgren and Svensson, 2019). The HBGAs are complex carbohydrates and their synthesis is directed by transferases encoded by the *ABO(H)* (A, B and H antigens), *FUT2* (*Se*) and *FUT3* (*Le*) genes (Marionneau et al., 2001). Individuals who secrete A or B antigens also secrete H antigens. Non secretors have a non-functional *FUT2* enzyme, and so do not secrete those antigens even though they are expressed in their red blood cells (RBCs). The Lewis system consists of two major antigens, and three common phenotypes: *Le* ($a - b -$), *Le* ($a + b -$), and *Le* ($a - b +$) (Cooling, 2015).

Amino acid substitutions caused by specific mutations (or single nucleotide polymorphisms 'SNPs') in the *FUT3* gene, such as 59 T > G, 202 T > C, 314C > T, 508G > A and 1067 T > A, can lead to an inactivation or decreased activity of the Lewis enzyme (Koda et al., 1993; Elmgren et al., 1996), resulting in a Lewis negative phenotype; in the *FUT2* gene, the nonsense mutation 428G > A is characteristic for the non-secretor phenotype (Kelly et al., 1995) and a missense mutation (385A > T) commonly found in Asian populations leads to low levels of *FUT2* enzyme (Cooling, 2015).

Previous studies have shown that non-secretors are more resistant to GII.4 infection (Thorven et al., 2005; Tan et al., 2008); however, many questions regarding norovirus susceptibility, particularly to other genotypes, remain unanswered (Ramani et al., 2016; Cannon et al., 2019; Nordgren and Svensson, 2019). Considering this matter, vaccine trials and challenge studies should consider the individuals' secretor profile in order to understand the impact of genetic susceptibility on norovirus vaccine efficacy (Mattison et al., 2018).

Birth cohort studies are important to understand the immunity following natural infections (Lopman and Kang, 2014; Cannon et al., 2019), as well as to investigate the circulation of norovirus genotypes in healthy individuals, especially in developing countries (Lopman et al., 2015); and how the host genetic profile can affect the burden of disease, in order to achieve the best vaccination strategies.

In Brazil, some norovirus community-based studies have been reported (Linhares et al., 1989; Vicentini et al., 2013; Siqueira et al., 2017), although none of these have simultaneously evaluated the incidence of norovirus infection in a birth community-cohort, the circulating genotypes and host genetic susceptibility profile (Cannon et al., 2019). In this study we describe the results of a longitudinal study aimed to investigate the incidence of norovirus and its genetic diversity in a birth community-cohort of children vaccinated against RVA in Rio de Janeiro, Brazil and the association between norovirus infection and the HBGA host genetic susceptibility profile.

2. Material and methods

2.1. Study design and collection of the clinical samples

This study approved by the Ethics Committee of Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases/FIOCRUZ (CEP 688.566/14),

and is part of a longitudinal study of acute gastroenteritis surveillance conducted in the Mangueiras community, neighboring the main campus of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro city, Brazil.

One-hundred thirty-two children enrolled in a birth to 11-month-old community-cohort from November 2014 to November 2018 were followed up for 16,212 child-days, ranging from 7 to 285 days. Clinical samples were sent to the Regional Rotavirus Reference Laboratory/Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LCEV) and were frozen at -20°C for further analysis. A median of five stool samples per child (ranging from 2 to 9 samples) totalizing 569 samples and 132 saliva samples (1 sample/child) were obtained. Previously, all stool specimens were screened for RVA, and saliva samples were used to investigate the HBGA secretor status and *FUT2* genotyping (Cantelli et al., 2020). Diarrhea was characterized as \geq three liquid/semi liquid evacuations in a 24-h period, and asymptomatic cases were defined with no episodes of diarrhea for at least 1 week before the collection date. A new norovirus episode was defined when it occurred >4 weeks after the previous episode.

2.2. RNA extraction from fecal specimens and viral detection

Total nucleic acid was extracted from clarified stool specimens (20% w/v) using an.

automatic RNA extraction procedure according to the manufacturer's instructions (QIAcube[®] Automated System and QIAamp[®] Viral RNA Mini kit, Qiagen, CA, USA). RNA viral samples were screened for the presence of norovirus (GI/GII) using a multiplex one-step reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) on an Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described (Kageyama et al., 2003; Fumian et al., 2016). The norovirus RT-qPCR result was considered positive if the cycle threshold (Ct) value was <40 and presented a characteristic sigmoid curve. Besides that, samples which were positive in the first screening were confirmed after the second test, in triplicate.

2.3. Norovirus genotyping and phylogenetic analysis

RT-PCR was performed for norovirus genotyping (B (RdRp) and C (Capsid) regions) using Qiagen One-step RT-PCR (Qiagen) and Mon431/G2SKR (GII) and Mon432/G1SKR (GI) primers as previously described (Cannon et al., 2017) to generate 570-base-pair (bp) and 579-bp fragments, respectively. The following thermocycling conditions were performed: DNA synthesis and pre-denaturation at $42^{\circ}\text{C}/30$ min, denaturation at $95^{\circ}\text{C}/15$ min, then 40 cycles of $95^{\circ}\text{C}/1$ min, $50^{\circ}\text{C}/1$ min and $72^{\circ}\text{C}/1$ min, followed by a final elongation step ($72^{\circ}\text{C}/10$ min). When this first round did not yield any products, a second round of amplification (semi-nested PCR) was performed in a subset of samples using the primers COG2F/G2SKR (GII) or COG1F/G1SKR (GI) to generate 390-bp and 380-bp fragments, respectively (Kojima et al., 2002; Kageyama et al., 2003).

To assess the major epitopes of the VP1 protein region in GII.4 norovirus strains, the P2 subdomain was amplified using EVP2F/EVP2R primers (674-bp fragment) as previously described (Vega et al., 2014). The amplicons were purified using Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Madison, USA) or ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The purified products were sequenced using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the ABI Prism 3730 or 3500 Genetic Analyzer[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences (consensus) and electropherograms were analyzed using the BioEdit 7.2.1 Sequence Alignment Editor (Hall, 1998). Nucleotide similarity was assessed using the Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and norovirus genotypes were assigned using the Norovirus Automated Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)

(Kroneman et al., 2011). Phylogenetic analysis was performed using the maximum-likelihood method, with the K2 + G + I and K2 models applied for analysis of portions of the regions encoding the polymerase (RdRp, region B) and VP1 (region C), respectively. Phylogenetic trees were constructed with 2000 bootstrap replicates in MEGA v.7.0.26 (Kumar et al., 2016). Deduced amino acid sequences of the P2 sub-domain (GIL4 strain) were compared with the Brazilian (KF434585) and American (KX907727, MK762561) strains circulating in different years, using the BioEdit 7.2.1 Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). The sequences obtained in this study were submitted to GenBank under the accession numbers MH393567, MH393572-MH393573, MN428922-MN428933 and MN428935-MN428939.

2.4. HBGA phenotyping and the secretor status in saliva

The HBGA secretor status was previously evaluated for this cohort (Cantelli et al., 2020). An enzyme immunoassay (EIA) was performed to detect ABO histo-blood groups and Lewis phenotype, and the secretor status was tested in Le (a-b-) saliva samples by *Ulex europaeus* lectin EIA as previously described (Nordgren et al., 2014; Moraes et al., 2019).

2.5. Genomic DNA extraction from saliva and *FUT2* and *FUT3* genotyping

DNA total was extracted from each saliva specimen collected from children phenotyped as Le (a + b +) secretor and non-secretor, Le (a-b-) or Le (a + b-), aiming to confirm the phenotype status. In our previous study (Cantelli et al., 2020), the touchdown PCR was performed to genotyping of SNPs in the *FUT2* gene by Sanger nucleotide sequencing as previously described (Nordgren et al., 2014; Moraes et al., 2019). In a subset of saliva samples (n = 21) phenotyped as Le (a-b-), touchdown PCR was performed to genotyping of SNPs in the *FUT3* gene as previously described (Nordgren et al., 2014; Olivares et al., 2020, unpublished results).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v.8.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Frequencies of norovirus detection in different age groups and susceptibility profiles were investigated using the Chi-square or Fisher's exact test, with a significance level of 5.0%. The incidence rate for norovirus infection (child-time) was based on the total follow-up duration for each child (new norovirus episodes during follow-up divided by sum of the person-time-at-risk during the observation time).

3. Results

3.1. Frequency and incidence of norovirus in the Manginhos cohort

In total, 569 samples were obtained, representing 41 from acute diarrheic episodes (ADE) and 528 from non-ADE. We detected noroviruses in 32 of 569 samples (5.6%) and observed the highest

Table 2

Norovirus (genogroups/genotypes) detection (32 samples) in 28 children from a birth community-cohort, Manginhos, Rio de Janeiro city, Brazil, 2014–2018*. Information about norovirus RT-qPCR Ct value, clinical symptoms (acute diarrheic episode/ADE or non-ADE) and age are described.

Year	Norovirus	Code child	Ct value	ADE	non-ADE	Age
2015	GIL4 Sydney 2012[P31]	029	23.9	–	1	2 m 8d
	GIL4 Sydney 2012[P31]	009	15.8	–	1	5 m 10d
	GIL6[P77]	014	16.4	–	1	2 m 8d
	GIL6[P77]	016	20.5	–	1	4 m 20d
	GIL4 Sydney 2012	095	39.2	–	1	14d
	GII	001	39.4	–	1	4 m
	GII	017	35.7	–	1	1 m 15d
	GII	224	37.6	–	1	1 m
	GII	071	38.8	–	1	4 m 26d
	GII	096	33.6	–	1	1 m 18d
	GII	202	37.9	–	1	1 m 21d
	2016	GIL4 Sydney 2012[P16]	169	17.8	1	–
GIL4 Sydney 2012[P16]		222	33.2	1	–	10 m
GIL3[P13]		160	34.3	–	1	4 m 13d
GIL4 Sydney 2012		219	32.4	1	–	10 m
GII		144	36.4	–	1	5 m 27d
GII		212	38.2	1	–	5 m 16d
GII		225	31.7	–	1	20d
GII		225	36.5	–	1	5 m
GII		226	32.7	–	1	2 m 17d
GII		250	29.7	–	1	1 m 1d
2017	GIL6[P77]	289	19.3	–	1	5 m 3d
	GIL4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009]	265	13.2	1	–	6 m 2d
	GIL4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009]	265*	21.4	1	–	6 m 12d
	GIL2[P16]	275	16.2	–	1	1 m 3d
	GIL2[P16]	275*	16.7	–	1	1 m 11d
	GII	275	27.7	1*	–	2 m 14d
	GIL4 Sydney 2012	291	32.7	–	1	1 m 16d
	GIL2	274	35.3	–	1	27d
	GIL2	282	34.4	–	1	28d
	GII	234	38.8	–	1	14d
	GII	293	38.9	–	1	1 m

* At the end of 2014 and at the beginning of 2018, norovirus strains were not detected in children between 0 and 11 months of age. m = months, d = days;

* This child was observed to shed the GIL4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009] genotype after an interval of 10 days.

* This child was observed to shed the GIL2[P16] norovirus genotype after an interval of 8 days (Ct value 16.7), and approximately after 30 days, the GII was detected. * in this sample a G1P[8] rotavirus vaccine shedding was codetected.

detection rate (16.1%, 5/31) in children belonging the group between 6 and 11 months old ($p < .001$) (Table 1). Regarding the viral load, the median Ct value observed was 27.7 and 34.3 for ADE and non-ADE, detected in 7 of 41 (17.1%) and 25 of 528 (4.7%) samples, respectively, representing 21.2% (28/132) of children enrolled in this study. Considering all norovirus-positive samples, the Ct value ranged from 13.2 to 39.4 (median of 32.9) and from 5.6×10^5 to 1.44×10^9 genome

Table 1

Norovirus detection from stool samples collected from the infants/children with acute diarrheic episodes (ADE) or not (non-ADE) according to age group.

Age group	Number of followed-up children	Clinical status				Number of positive samples/number of stool samples investigated (%)	p value ^a
		Norovirus positive		Norovirus negative			
		ADE	non-ADE	ADE	non-ADE		
< 2 months	127	0	14	5	285	14/304 (4.6)	< 0.0001
2 - < 6 months	125	2	11	14	207	13/234 (5.6)	
6-11 months	24	5	0	15	11	5/31 (16.1)	
Total	132	7	25	34	503	32/569 (5.6)	

^a p value was determined by Fisher's exact test.

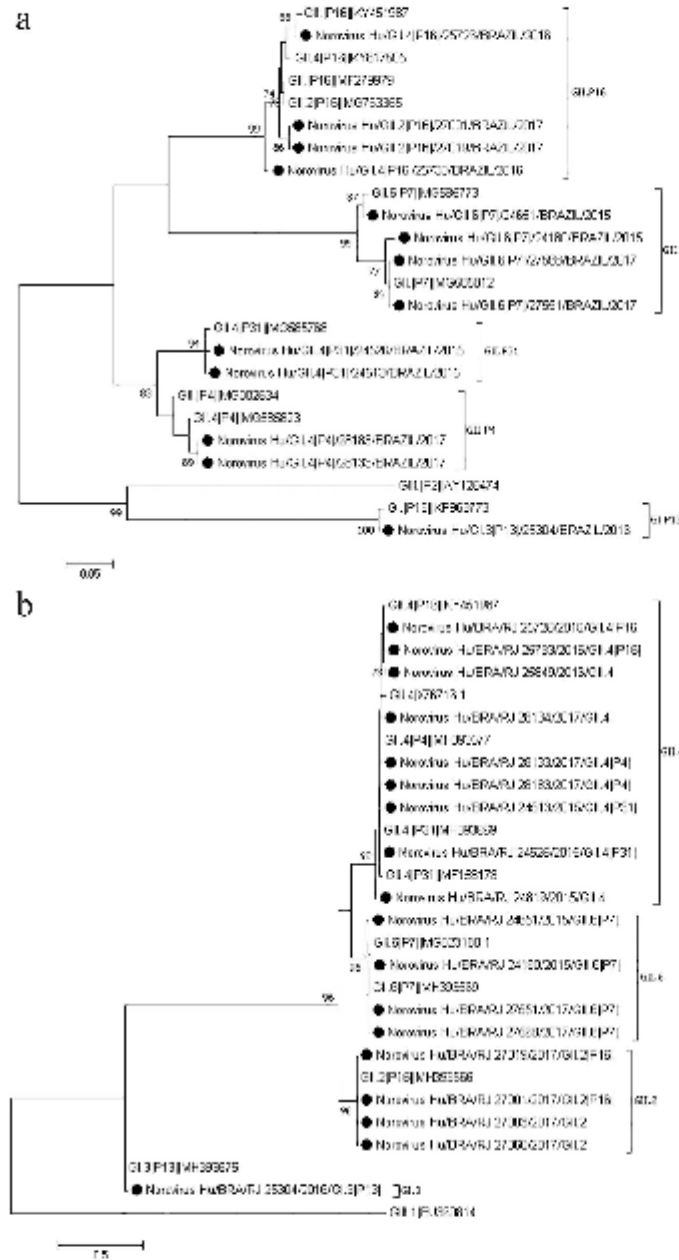


Fig. 1. Phylogenetic analysis of GI/GII noroviruses based on partial nucleotide sequences of the polymerase and capsid regions (Cannon et al., 2017) from infants and children from a birth community-cohort, from 2014 to 2018, in Mangunhos, Rio de Janeiro city, Brazil. (A) Phylogenetic tree of a 199-bp portion of the B region (polymerase), and (B) Phylogenetic tree of a 215-bp portion of the gene encoding the C region (VP1). Nucleotide sequences were analyzed using the maximum-likelihood method with the K2 + G + I and K2 nucleotide substitution models, respectively, and bootstrap values >70% are shown at the nodes of the tree as percentages based on 2000 replicates. The strains reported in this study are indicated by filled black circles. The reference strains of norovirus genotypes are shown with their respective GenBank accession numbers.

copies/ mL. During the period of the study, no norovirus seasonality was observed and the incidence rate was 5.8 infections per 100 child-months (or 69 infections per 100 child-years), between 14 days and 10 months of age.

Norovirus GII and GI were detected in 30 (93.8%) and 2 (6.2%) samples, respectively. Of these, we detected GII norovirus in 7 ADE and 23 non-ADE cases, whilst GI was only detected in two non-ADE cases (Table 2). It was observed that 26 of 28 children (92.9%) had one

norovirus infection, and two children showed sequential infections. In one child, norovirus GII was detected both at the age of 20 days and 5 months, both as non-ADE cases. A 1-month-old child who presented non-ADE case was observed to shed the norovirus GII.2[P16] genotype during an interval of 8 days and, after 30 days, norovirus GII persisted, being detected in an ADE case. And one other 6-month-old ADE child was observed to shed the norovirus GII.4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009] genotype during an interval of 10 days.

3.2. Molecular characterization of norovirus in the Manguinhos cohort

Norovirus was genotyped in 18 of 32 positive samples (56.3%) (Fig. 1) with 13 samples being genotyped both the B (RdRp) and C (Capsid) regions. Six different genotypes were detected. The most frequent norovirus genotype detected was GII.6[P7] ($n = 4$), followed by GII.4 Sydney 2012[P31] ($n = 2$), GII.4 Sydney 2012[P16] ($n = 2$), GII.2[P16] ($n = 2$), GII.4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009] ($n = 2$) and GII.3[P13] ($n = 1$). 15.6% of norovirus samples ($n = 5$) could only be amplified using the semi-nested PCR (C region), and norovirus was characterized as GII.4 Sydney 2012 ($n = 3$) and GII.2 ($n = 2$) strains.

The GII.4 Sydney 2012 genotype was detected during the entire period of the study in association with three different polymerase types along the years, GII-P31 detected in 2015, GII-P16 in 2016 and GII-P4 New Orleans 2009 in 2017, and the genotype GII.2, harboring the polymerase type GII-P16, was identified circulating in 2017 (Table 2). We also characterized the P2 subdomain of six GII.4 Sydney 2012 strains, and the molecular analysis showed amino acid substitutions in the positions 297 and 372 (epitope A), 333 (epitope B), 340 (epitope C), and 357 (epitope G) (Table S1) between the samples.

3.3. Norovirus infection and host susceptibility status

In order to associate norovirus infection and host susceptibility profile in this cohort, the HBGA phenotyping previously performed for this population was considered (Cantelli et al., 2020). Regarding the secretor status, 80.3% ($n = 106$) were secretors, 15.9% ($n = 21$) non-secretors and 3.8% ($n = 5$) inconclusive. Concerning the Lewis phenotype, 59.8% ($n = 79$) of the children were Le ($a + b +$), 13.6% ($n = 18$) Le ($a - b +$), 15.9% ($n = 21$) Le ($a - b -$), and 10.6% ($n = 14$) Le ($a + b -$).

The noroviruses were detected in 24 infants/children secretors (92.3%) and in only two non-secretors. All norovirus detected in ADE were reported from secretors (Le^b) ($p = .02$) (Table 3), and in asymptomatic norovirus cases (non-ADE), a significantly proportion was detected in Le ($a + b +$) secretors (80.9%). In this cohort, twenty-one children were phenotyped as Lewis negative, 9 being secretors and 9 non-secretors, and the noroviruses were detected in two of these children, one secretor and one non-secretor.

Table 3
Distribution of the Secretor/Lewis children ($n = 26$) with norovirus in acute diarrheic episode (ADE) and non-ADE in a birth community-cohort, Manguinhos, Rio de Janeiro city, Brazil, between November 2014 and November 2018.

Secretor/Lewis profile	Norovirus		Norovirus		p value ^a
	ADE		non-ADE		
	n = 5	(%)	n = 21	(%)	
Secretor	5	(100)	19	(90.5)	0.47
Non-secretor	0	(0)	2	(9.5)	
Le($a + b +$)	0	(0)	1	(4.8)	0.02
Le($a - b +$)	3	(61)	1	(4.8)	
Le($a + b -$)	2	(41)	17	(80.9)	
Le ($a - b -$)	0	(0)	2	(9.5)	

^a p values were determined by Chi-square test.

3.4. FUT2 and FUT3 genotyping

The FUT2 gene was previously sequenced in children phenotyped as secretor Le ($a + b +$) and non-secretors (Cantelli et al., 2020) and the distribution of the FUT2 genotypes (SNPs identified in the Manguinhos population) in norovirus positive children is described in Table 4.

For 21 children phenotyped as Le ($a - b -$), FUT3 genotyping was performed, and twenty-six SNPs were identified, of which the most frequent were rs28362459 (59 T > C) and rs3745635 (508G > A) (66.7%), followed by rs812936 (202 T > C), rs778986 (314C > T) and rs28381968 (808G > A) (23.8%), rs28362463 (484G > A, 19.0%), rs28362460 (61C > T), rs5655905 (732C > T) and rs3894326 (1067 T > A) (14.3%) (Fig. 2). Seven new mutations were identified: 13G > A (19%), 362 T > C, 588G > A, 601A > G, 602A > G, 607G > A (4.8%) and, 1052A > G (9.5%) and 10 other SNPs were detected in low frequency: rs28362461 (72G > C), rs749920542 (393C > A), rs372597863 (606G > A), rs28362465 (612A > G), rs148170391 (645 T > C), rs765224654 (696G > A), and rs28381969 (974C > T) (4.8%), rs28362466 (667G > A), rs750177892 (691A > C) and, rs150418165 (968G > C) (9.5%).

4. Discussion

This study reports the frequency and incidence of norovirus infection as well as the circulating genotypes and host HBGA genetic susceptibility profile in infants/children from a community-cohort conducted in Manguinhos, Rio de Janeiro. The same birth cohort previously assessed the G1P[8] rotavirus vaccine (RV1) shedding and the HBGA host genetic susceptibility profile in infants from birth to 11 months of age (Cantelli et al., 2020). During this cohort study noroviruses were more frequent than rotaviruses, and a high diversity of norovirus genotypes circulated among these infants/children, predominantly in asymptomatic episodes.

Several studies have shown the importance of establishing the cut-off Ct values for norovirus diagnosis to differ between symptomatic and asymptomatic infection (Phillips et al., 2009; Trang et al., 2015). In our study, most of the samples investigated were from asymptomatic infants/children. Prolonged periods of norovirus shedding in asymptomatic individuals has been described as a common and important characteristic for norovirus transmission efficiency (Phillips et al., 2010; Teunis et al., 2015). As a criterion for evaluating the positivity for norovirus in this sampling, we verified that some norovirus positive samples with high RT-qPCR Ct values, could be genotyped one successfully genotyped sample had a Ct value of 39.2. For this reason, in this study, the Ct value < 40 was considered as norovirus positive.

The frequency of norovirus in the Manguinhos cohort was 5.6%, with 17.1% detected in ADE and 4.7% in non-ADE cases. Norovirus prevalence in non-ADE cases was similar (5%, 95% CI: 4–8%) to that reported by Nguyen et al. (2017). A meta-analysis study recently described the prevalence of asymptomatic norovirus infection worldwide and found a similar detection rate (7%) compared to rate found in the present study (Qi et al., 2018). The detection rate of norovirus in ADE cases in this study was similar to rates found by these recently published meta-analysis studies (17–18%) (Nguyen et al., 2017; Qi et al., 2018).

According to child age stratification, the highest norovirus detection rate in the cohort was after 6 months of age (16.1%), consistent with other birth cohort studies worldwide (Rouhani et al., 2016; Cannon et al., 2019), although in this age group (6–11 months old), a considerable number of children had discontinued the follow-up, and a low number of stool samples was provided.

In our study, we found an incidence of norovirus infection of 5.8 infections per 100 child-months between 0 and 11 months of age. This norovirus incidence rate was similar to the rate found in a study conducted in Chile, using samples from a birth-cohort collected between 2006 and 2008 from asymptomatic infections from children aged

Table 4

Norovirus (capsid genotypes) and host susceptibility (Secretor/Lewis) status and FUT2 genotyping in children from a birth community-cohort, Manguinhos, Rio de Janeiro city, Brazil, 2014–2018.

Norovirus genotypes	n children	Secretor status	Lewis status	FUT2 genotyping
GIL4 Sydney 2012	3	Se	Le (a + b +)	Se 171A=C, 23AC=T, 327T=C, 43C=A, 73C=A, 96A=C, 109A=C, 1011T=C
	1	se	Le (a + b)	se 171A=C, 23AC=T, 327T=C, 43C=A, 34C=A, 73C=A, 771C=A, 96A=C, 109A=C, 1011T=C
	3	Se	2 Le (a-b+), 1 Le (a-b)	NI
	1	Se	Le (a + b +)	Without SNP
GIL6	3	Se	2 Le (a + b +), 1 Le (a-b+)	Se 171A=C, 23AC=T, 327T=C, 43C=A, 73C=A, 96A=C, 109A=C, 1011T=C
GIL2	3	Se	Le (a + b +)	Se 171A=C, 23AC=T, 327T=C, 43C=A, 73C=A, 96A=C, 109A=C, 1011T=C
GIL3	1	Se	Le (a + b +)	Se 171A=C, 23AC=T, 327T=C, 43C=A, 73C=A, 96A=C, 109A=C, 1011T=C

Notes: Se = heterozygous secretor, se = homozygous non-secretor, NI = no information; SNP = single nucleotide polymorphism.

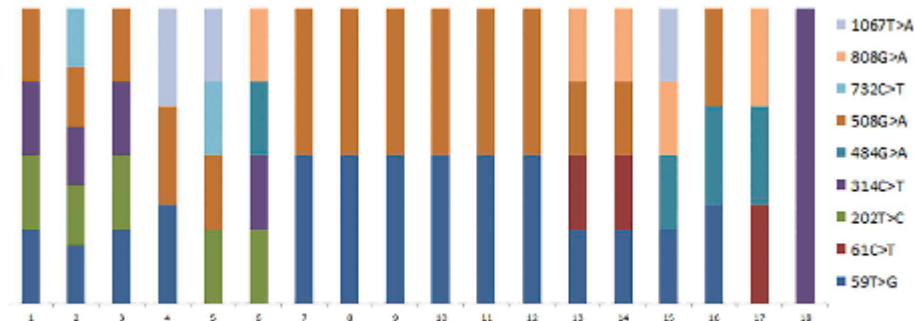


Fig. 2. Distribution of nine SNPs in *FUT2* gene more frequent in the children ($n = 18$) from birth community-cohort phenotyped as Le (a-b-). Norovirus was detected in three children (5, 8, 11, and) in non-acute diarrheic episodes (non-ADE), from 1 month to 2 months and 8 days of age. The study was conducted between November 2014 and November 2018, in Manguinhos, Rio de Janeiro city, Brazil.

0–5 months (5.7 cases per 100 child-months) (O’Ryan et al., 2009). Similar findings were also described in a birth cohort study in Ecuador in 2009 that showed a peak incidence of 6.3 cases per 100 child-months among 6 to 11 months of age from asymptomatic infections (Lopman et al., 2015).

The majority of the noroviruses in this study were detected in non-ADE cases from 0 to 5 months of age (78%, 25/32). This can be explained by breastfeeding during the first months of life in the birth cohort, by which maternal antibodies and human milk oligosaccharides rich in α 1,2-linked fucosylated glycans (depending on the mother’s secretor/Lewis status) can act as first line of defense against severe norovirus disease (diarrhea) in breastfed infants (Jiang et al., 2004; Newburg et al., 2004; Lopman and Kang, 2014; Saito et al., 2014; Bode, 2015; Siqueira et al., 2017; Krammer and Bouckaert, 2018).

Most of the norovirus strains screened were classified as GII (93.8%) and five different genotypes were identified. Overall, the GII.4 Sydney 2012 variant was the most prevalent genotype (50%, 9/18), in agreement with several surveillance studies in Brazil and worldwide (Fioretti et al., 2014; Vinjé, 2015; Cannon et al., 2017; Costa et al., 2017). This variant circulated harboring three different polymerase types: GII-P31, GII-P16 and GII-P4 New Orleans 2009 similar to that reported in our previous study (Cantelli et al., 2019) during the same period (2015–2017), in children between 1 and 4 years of age in the Manguinhos community. The analysis of the P2 subdomain of the GII.4 Sydney 2012 strains (GII.4[P31], GII.4[P16] and GII.4[P4]) showed amino acid substitutions with variability patterns similar to those previously described by Cannon et al. (2017) and Barclay et al. (2019) in their studies with this variant. The previously described G and H (NERK motif) epitopes (Tohma et al., 2019) were also analyzed in this study and similar amino acids were detected. Tohma et al. (2019) suggest the 352, 357 and 378 residues (epitopes C and G) seem to play a major role in the antigenic topology and emergence of new GII.4 variants.

In the Manguinhos cohort, the emergent norovirus polymerase type GII-P16 was identified in association with two capsid genotypes, GII.4 Sydney 2012 and GII.2 in 2016 and 2017, respectively. Both these strains have been described causing acute gastroenteritis outbreaks worldwide in these same years (Barreira et al., 2017; Li et al., 2018; Niendorf et al., 2017; Hata et al., 2018; Medici et al., 2018).

In 2017, we reported the emergent recombinant GII.2(P16) for the first time in Brazil (Cantelli et al., 2019) in 2 ADE children aged 22 and 48 months. In the present birth-cohort study, this recombinant was identified from an asymptomatic child 1-month-old, and molecular analysis showed a high similarity (> 99% nt identity) between this strain and German strains (Niendorf et al., 2017).

Concerning the genetic susceptibility, studies in association with norovirus infection in asymptomatic individuals are rare (Nordgren and Svensson, 2019); the majority of norovirus asymptomatic infections in this study were detected in Le (a + b +) secretor infants/children, associated with the most common capsid genotypes, GII.4 Sydney 2012 and GII.6, having previously been associated with positive secretor status (Currier et al., 2015; Sharma et al., 2019). However, one non-secretor child, confirmed with FUT2 genotyping, was infected with GII.4 Sydney 2012 (in non-ADE case), similar to that reported by some studies (Prencik et al., 2012; Nordgren et al., 2013); besides that, other non-secretor child was infected with norovirus GII in non-ADE case. Probably there might be differences regarding norovirus symptomatic and asymptomatic infections, and some non-secretor individual can be infected but then leading to norovirus asymptomatic infections. A significant correlation between norovirus symptomatic infection and secretor status (Le^b) was observed, with all symptomatic norovirus cases occurring in secretors.

The high percentage of children characterized as secretors found in our cohort, in agreement with other studies conducted in Latin America (Vicentini et al., 2013; Lopman et al., 2015; Bucardo et al., 2018;

Morses et al., 2019), coupled with a limited number of samples representative of each genotype, hamper the assessment of any association between host susceptibility vs norovirus genotypes, and is a limitation of our study. Secretor individuals with a Le (a + b +) phenotype can be susceptible to different norovirus genotypes, both secretor-dependent or -independent (Nordgren and Svensson, 2019).

According to our results, low detection of norovirus in Le (a-b-) children could suggest this profile has 'some degree' of resistance to norovirus, mainly when associated to the non-secretor status (approximately 50% of the Le (a-b-) children were characterized as non-secretors). According to studies conducted in Burkina Faso (Nordgren et al., 2013) and Nicaragua (Bucardo et al., 2009), both Lewis negative and Lewis positive secretors individuals were susceptible to norovirus compared to non-secretors, indicating the importance of the FUT2 gene as a mediator of susceptibility (Bucardo et al., 2009; Kindberg and Svensson, 2009; Nordgren and Svensson, 2019).

In our study we sequenced the FUT3 gene to determine the occurrence of the main SNPs in children with Le (a-b-) status in Manguinhos cohort. The main mutations rs28362459 (59 T > G), rs812936 (202 T > C), rs778986 (314C > T), rs3745635 (508G > A), and rs3894326 (1067 T > A) leads to reduction or inactivation of the $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase. These mutations appear to be distributed worldwide (Koda et al., 1993; Pang et al., 1998), and were also identified in previous studies in Brazil (Corvelo et al., 2013; Olivares et al., 2020, unpublished results). Pang et al. (1998) reported nonfunctional $Le^{484,667}$ and $Le^{484,667,808}$ alleles in FUT3 gene, in South African individuals (including the black Xhosa-Africans). Few studies have estimated the distribution of these SNPs in African Americans (Cakir et al., 2002). In the Manguinhos cohort was possible to identify the occurrence of the mutations rs28362463 (484G > A), rs28362466 (667G > A), and rs28381968 (808G > A) suggesting a genetic proximity between Africa and Rio de Janeiro population.

5. Conclusion

Our results show the norovirus incidence/frequency, circulating genotypes and host susceptibility profile in a birth cohort in Manguinhos, Rio de Janeiro. This study describes for the first time the evaluation of norovirus incidence and the association between norovirus symptomatic infection and the secretor status of children from a birth community-cohort in Brazil. Besides that emphasizes the norovirus diversity circulating during the rotavirus vaccination period, mainly in asymptomatic episodes, demonstrating the emergence of these viruses and the importance of surveillance studies in communities after the introduction of rotavirus vaccines and in this norovirus pre-vaccination era. These results will be able to contribute to understanding of these questions that have an impact on public health.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104280>.

Funding

This study was funded by "The Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz/PAEF2", "The Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro" (FAPERJ) and, "The National Council for Scientific and Technological Development" (CNPq 424,376/2016-4). T.M. Fumian, M.P. Miagostovich and J.P.G. Leite are FAPERJ and CNPq fellows.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the parents and infants who participated in this study. We would like to thank Miriã Alves Gonçalves Trindade for her help with the collection of specimens and clinical data. We would like to thank Sérgio da Silva e Mouta Junior and Alexandre Madi Fialho for the laboratorial support. We would like to thank the staff members of "the FIOCRUZ Institutional Platform for DNA sequencing (PDTIS)" and of "the Quality Control of the Bio-Manguinhos (DEQUA)" for technical support.

References

- Ahmad, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Panislar, U.D., Koopmans, M., Lopman, B.A., 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 725–730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4).
- Barclay, L., Cannon, J.L., Wikswo, M.E., Phillips, A.R., Browne, H., Montmayeur, A.M., Tshosov, R.L., Burke, R.M., Hall, A.J., Vinjé, J., 2019. Emerging novel GILP16 norovirus associated with multiple capsid genotypes. *Viruses* 11 (6), 535. <https://doi.org/10.3390/v11060535>.
- Barreira, D.M.F.C., Purnian, T.M., Tontri, M.A.L., Voipini, L.P.B., Santos, R.P., Ribetto, A.L.C., Leite, J.P.G., Souza, M.T.B.M., Brasil, P., da Cunha, D.P., Miagostovich, M.P., Spino, L.C., 2017. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GILP16-GIL4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One* 12 (12), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189504>. e0189504.
- Bode, L., 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum. Dev.* 91 (11), 619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earhumdev.2015.09.001>.
- Bucardo, F., Kindberg, E., Pantagna, M., Grahn, A., Larson, C., Vildervall, M., Svensson, L., 2009. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J. Med. Virol.* 81, 728–735.
- Bucardo, F., Nordgren, J., Reyes, Y., Gonzalez, F., Sharma, S., Svensson, L., 2018. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotavirus and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Sci. Rep.* 8, 1502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19718-y>.
- Calder, B., Pankow, J.S., Saizawa, V., Couper, D., Morris, T.L., Brantley, K.R., Hillier, K.M., Helos, C., Weston, B.W., 2002. Distribution of Lewis (FUT3) genotype and allelic frequencies in a ethnically United States population. *Ann. Hematol.* 81, 558–565. <https://doi.org/10.1007/s00277-002-0508-x>.
- Cannon, J.L., Barclay, L., Collins, N.R., Wikswo, M.E., Castro, C.J., Magana, L.C., Gregorich, N., Marine, R.L., Chhabra, P., Vinjé, J., 2017. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GIL4 recombinant viruses. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2268–2221. <https://doi.org/10.1128/JCM.00455-17>.
- Cannon, J.L., Lopman, B.A., Payne, D.C., Vinjé, J., 2019. Birth cohort studies assessing norovirus infection and immunity in young children: a review. *Clin. Infect. Dis.* 69 (2), 357–365. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy985>.
- Canelli, C.F., da Silva, M.F.M., Purnian, T.M., da Cunha, D.C., de Andrade, J.S.R., Malta, F.C., de Silva e Mouta Junior, S., Fialho, A.M., de Moraes, M.T., Brasil, P., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., 2019. High genetic diversity of noroviruses in children from a community-based study in Rio de Janeiro, Brazil, 2014–2018. *Arch. Virol.* 164, 1427–1432. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04195-z>.
- Canelli, C.F., Veloso, A.J., Azeis, R.M.S.d., Barros, J.J., Mello, F.C.A., Cunha, D.C., Brasil, P., Nordgren, J., Svensson, L., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., Moraes, M.T.B., 2020. Rotavirus A shedding and HBGA host genetic susceptibility in a birth community-cohort, Rio de Janeiro, Brazil, 2014–2018. *Sci Rep* 10, 6965. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64025-0>.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Para, G.I., Chan, M.C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* 100 (10), 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>.
- Coating, L., 2015. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 801–870. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-14>.
- Corvelo, T.C.O., Lotola, R.S.F., Aguiar, D.C.F., Matos, G.C.B., Brito, D.C., 2013. The Lewis Histo-blood group system: molecular analysis of the 59T>G, 508G>A, and 1067T>A polymorphisms in an Amazonian population. *PLoS One* 8 (7), e69908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069908>.
- Costa, S.T.P., Purnian, T.M., Lima, I.C.G., Siqueira, J.A.M.S., Silva, L.D., Hernández, J.M., Lucena, M.S.S., Roymão, T.K.A., Soares, L.S., Mascarenhas, J.D.P., Gabby, Y.B., 2017. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon region, northern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112 (6), 391–395. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160357>.
- Currier, R.L., Payne, D.C., Staat, M.A., Selvarangan, R., Shirley, S.H., Haisa, N., Boom, J.A., Englund, J.A., Szilagyi, P.G., Harrison, C.J., Klein, E.J., Weinberg, G.A., Wikswo, M.E., Panislar, U., Vinjé, J., Morrow, A.L., 2015. Innate susceptibility to norovirus infections influenced by FUT2 genotype in a United States pediatric population. *Clin. Infect. Dis.* 60 (11), 1631–1638. <https://doi.org/10.1093/cid/civ165>.
- Elmgren, A., Börjesson, C., Svensson, L., Rysberg, L., Larson, G., 1996. 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.* 70, 97–103. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1996.tb01300.x>.
- Rioret, J.M., Bello, G., Rocha, M.S., Victoria, M., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2014.

- Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092988>. e092988.
- Prencik, R., Bernsteln, D.I., Xia, M., Huang, P., Zhong, W., Parker, S., Dickey, M., McNeal, M., Jiang, X., 2012. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *J. Infect. Dis.* 206 (9), 1386–1393. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis514>.
- Pumian, T.M., Lefia, J.P., Rocha, M.S., de Andrade, J.S., Florenti, J.M., de Azeis, R.M., Flaiho, A.M., Mligostovich, M.P., 2016. Performance of a one-stop quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and norovirus GI during two periods of high viral circulation. *J. Virol. Methods* 228, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jvmet.2015.11.008>.
- Class, R.I., Nosi, J., Ando, T., Fankhauser, R., Belliot, G., Mounts, A., Parashar, U.D., Bresse, J.S., Monroe, S.S., 2000. The epidemiology of enteric Caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.* 181 (2), S254–S261. <https://doi.org/10.1086/315588>.
- Green, K., 2013. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Calicivirinae: The Noroviruses*. In *Fields' Virology*, 6th ed. 1 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Hall, T.A., 1998. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hata, M., Nakamura, N., Kobayashi, S., Onouchi, A., Saito, T., Hirose, E., Adachi, H., Saito, N., Ito, M., Yasui, Y., Matsumoto, M., Minagawa, H., 2018. Emergence of new recombinant norovirus GILP16-GIL2 and GILP16-GIL4 in Aichi, Japan, during the 2016/17 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 71, 319–322. <https://doi.org/10.7883/yjoikn.jid.2017.520>.
- Hoe Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cumliffe, N.A., Nakagomi, O., 2013. Molecular epidemiology of norovirus associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 56 (3), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011>.
- Huang, P., Parkas, T., Zhong, W., Tan, M., Parkas, T., Morrow, A.L., Jiang, X., 2005. Norovirus and Histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol.* 79 (11), 6714–6722. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005>.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Marcus, D.M., Estes, M.K., 2003. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H Histo-blood group antigens. *J. Virol.* 77 (1), 405–415. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.1.405-415.2003>.
- Jiang, X., Huang, P., Zhong, W., Tan, M., Parkas, T., Morrow, A.L., Newburg, D.S., Rutz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., 2004. Human milk contains elements that block binding to human Histo-blood group antigens in saliva. *J. Infect. Dis.* 190 (10), 1850–1859. <https://doi.org/10.1086/425159>.
- Kagayama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takada, N., Katsuyama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41 (4), 1548–1557. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.C., 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>.
- Kimberg, E., Svensson, L., 2009. Genetic basis of host resistance to norovirus infection. *PLoS Pathog.* 4 (4), 369–382. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.009014>.
- Koda, Y., Kimura, H., Makioka, E., 1993. Analysis of Lewis fucosyltransferase genes from the human gastric mucosa of Lewis-positive and -negative individuals. *Blood* 82 (9), 2915–2919. <https://doi.org/10.1182/blood.V82.9.2915.bloodjournal8292915>.
- Kojima, S., Kagayama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Naito, K., Takada, N., Katsuyama, K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100 (1–2), 107–114. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00404-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00404-9).
- Koo, H.L., Neill, F.H., Estes, M.K., Munoz, F.M., Cameron, A., DuPont, H.L., Atmar, R.L., 2013. Norovirus: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. *J. Pediatr. Inf. Dis. Soc.* 2 (1), 57–60. <https://doi.org/10.1093/pids/pis070>.
- Kramer, E.M., Boeckaert, J.M.J., 2018. Norovirus devalues human milk oligosaccharides rich in alpha-Fucose. *J. Biol. Chem.* 293 (30), 11966–11967. <https://doi.org/10.1074/jbc.H118.004336>.
- Kroneman, A., Vennema, H., DeBoer, K., Avocet H.v.d., Penaranda S., Oberste M.S., Vinjé J., Koopmans M., 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 51 (2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hanzman, C., Green, K., Mariella, V., Katsuyama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158 (10), 2059–2068. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5>.
- Kumar, S., Tamara, 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>.
- Li, J., Zhang, T., Cai, K., Jiang, Y., Guan, X., Zhan, J., Zou, W., Yang, Z., Xing, X., Wu, Y., Song, Y., Yu, X., Xu, J., 2018. Temporal evolutionary analysis of re-emerging recombinant GILP16.GII.2 norovirus with acute gastroenteritis in patients from Hubei Province of China, 2017. *Virus Res.* 249, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.016>.
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoon, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., Le Pendu, J., Baric, R., 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9 (5), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nm860>.
- Linares, A.C., Cabby, Y.B., Freitas, R.B., da Rosa, E.S., Mascarenhas, J.D., Loureiro, E.C., 1989. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol. Infect.* 102, 129–145. <https://doi.org/10.1017/S0950268800020769>.
- Lopman, B., Kang, C., 2014. In praise of birth cohorts: norovirus infection, disease, and immunity. *Clin. Infect. Dis.* 58 (4), 492–494. <https://doi.org/10.1093/cid/cit785>.
- Lopman, B.A., Trivedi, T., Vicuña, Y., Costantini, V., Collins, N., Gregoricus, N., Parashar, U., Sandoval, C., Broncano, N., Vaca, M., Chico, M.E., Vinjé, J., Cooper, P.J., 2015. Norovirus infection and disease in an Ecuadorian birth cohort: association of certain norovirus genotypes with host FUT2 secretor status. *J. Infect. Dis.* 211 (11), 1813–1821. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv672>.
- Marionneau, S., Caillieu-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoon, N., Clément, M., Le Pendu, J., 2001. ABE and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83, 565–573. [https://doi.org/10.1016/S0304-0084\(01\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0304-0084(01)01321-9).
- Mattison, C.P., Cardemil, C.V., Hall, A.J., 2018. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. *Expert Rev Vaccin* 17 (9), 773–784. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1510327>.
- Medici, M.C., Turmoilo, F., Martella, V., De Conin, F., Arcangeli, M.C., Pinardi, F., Ferraglia, F., Chezzi, C., Caldararo, A., 2018. Emergence of novel recombinant GILP16.GII.2 and GILP16.GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017. *New Microbiol.* 4 (1), 71–72.
- Moraes, M.T.B., Oliveira, A.L.O., Flaiho, A.M., Malta, F.C., da Silva E Mouta Junior, S., de Souza Bispo, R., Veloso, A.J., Alves Letitia, G.A., Cantilli, C.P., Nordgren, J., Svensson, L., Mligostovich, M.P., Lefia, J.P.C., 2019. 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.* 70, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.011>.
- Newburg, D.S., Rutz-Palacios, G.M., Alayse, M., Chaturvedi, P., Melman-Derr, J., Guerrer, M.L., Morrow, A.L., 2004. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 14 (5), 13C. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh086>.
- Nguyen, G.T., Phan, K., Tong, I., Pu, J., Watanabe, T., 2017. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine* 96 (40), e8139. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000008139>.
- Niendorf, S., Jacobsen, S., Faber, M., Els-Hilfinger, A.M., Hofmann, J., Zimmermann, O., Höme, M., Bock, C.T., 2017. Sharp rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GILP16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill* 22 (4). <https://doi.org/10.2807/1566-7917.ES.2017.22.4.30447>. pii=30447.
- Nordgren, J., Svensson, L., 2019. Genetic susceptibility to norovirus infection: an update. *Viruses* 11 (3), 226. <https://doi.org/10.3390/v11030226>.
- Nordgren, J., Niemi, L.W., Guermi, D., Simpore, J., Svensson, L., 2013. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. *PLoS One* 8 (7), e69557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069557>.
- Nordgren, J., Sharma, S., Bucardo, F., Nastr, W., Glinayon, C., Guermi, D., Niemi, L.W., Becker-Dreps, S., Simpore, 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/cit633>.
- O'Ryan, M.L., Lucero, Y., Prado, V., Santolaya, M.E., Rabeilo, M., Sotis, Y., Berríos, D., O'Ryan-Sortano, M.A., Cortés, H., Mamani, N., 2009. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28 (10), 879–884. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181a4b660>.
- Oliveira, A.L.O., Pimenta, Y.C., Letitia, G.A.A.L., Cantilli, C.P., Pumian, T.M., Flaiho, A.M., da Silva e Mouta Junior, S., Malta, F.C., Bispo, R.S., Mligostovich, M.P., Nordgren, J., Svensson, L., Lefia, J.P.C., Letitia M.T.B., Moraes, 2020. Rotavirus A and human norovirus infections in young Amazonian children in the context of susceptibility to Histo-blood group antigens (unpublished results).
- Pang, H., Liu, Y., Koda, Y., Soejima, M., Jia, J., Schlappe, T., du Toit, E.D., Kimura, H., 1998. Five novel missense mutations of the Lewis gene (FUT3) in African (Xhosa) and Caucasian populations in South Africa. *Hum. Genet.* 102 (6), 675–680. <https://doi.org/10.1007/s004300050760>.
- Phillips, G., Lopman, B., Tam, C.C., Iturriza-Gomara, M., Brown, D., Gray, J., 2009. Diagnosing norovirus associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect. Dis.* 9 (63), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-63>.
- Phillips, G., Tam, C.C., Conti, S., Rodrigues, L.C., Brown, D., Iturriza-Gomara, M., Gray, J., Lopman, B., 2010. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am. J. Epidemiol.* 171 (9), 1014–1022. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq021>.
- Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devesicharwar, B., Hall, A.J., Kirk, M.D., Duarte, A.S., Black, R.E., Angulo, F.J., 2015. Etiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of Diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One* 10 (12), e0142927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927>.
- Qi, R., Huang, Y., Liu, J., Sun, Y., Sun, X., Han, H., Qin, X., Zhao, M., Wang, L., Li, W., Li, J., Chen, C., Yu, X., 2018. Global prevalence of asymptomatic norovirus infection: a meta-analysis. *Criticalcaremedicine* 2-3, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.09.001>.
- Ramani, S., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2016. Correlates of protection against norovirus infection and disease—where are we now, where do we go? *PLoS Pathog.* 12 (4), e1005334. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005334>.
- Rouhani, S., Yori, P.P., Oorlogel, M.P., Saito, M.S., Trigo, D.R., Mondal, D., Scitidis, D., Platts-Mills, J., Samie, A., Khatir, F., Lima, A., Baiji, S., Mason, C.J., Kalam, A., Besong, P., Ahmed, T., Moura, E., Bhutta, Z.A., Lima, I., Ramdas, R., Lang, D., George, A., Zaki, A.K.M., Kang, C., Houpit, E., Kozak, M.N., 2016. Norovirus infection and acquired immunity in 8 countries: results from the MAL-ED study. *Clin. Infect. Dis.* 62 (10), 1210–1217. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw072>.

- Saito, M., Goto-Azuma, S., Espitia, S., Velazquez, D., Cabrera, I., Loh, S., Crabtree, J.E., Black, R.E., Kozak, M., Czeckley, W., Zimic, M., Bern, C., Cama, V., Gliman, R.H., Xiao, L., Kishor, D., Windle, H.J., van Doorn, L.J., Varela, M., Verastegui, M., Calderon, M., Aiva, A., Roman, K., 2014. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Peruvian community. *Clin. Infect. Dis.* 58 (4), 483–491. <https://doi.org/10.1093/cid/cit763>.
- Sang, S., Yang, X., 2018. Evolutionary dynamics of GII.17 norovirus. *PeerJ* 6. <https://doi.org/10.7717/peerj.4333>. e4333.
- Sharma, S., Hagbom, M., Carlsson, B., Ohl, J.N., Insuainder, M., Eriksson, R., Simonsson, M., Widerstrom, M., Nordgren, J., 2019. Secretor status is associated with susceptibility to disease in a large GII.6 norovirus foodborne outbreak. *Food Environ Virol.* <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09410-3>.
- Slobenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruijn, E., van der Veur, B., Sleszen, R.J., Koopmans, M., 2007. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* 81 (18), 9932–9941. <https://doi.org/10.1128/JVI.00674-07>.
- Slobenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.P., Vinjé, J., Lee, B.E., Pang, X.L., Ho, E.C., Lim, W., Choudhary, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N.B., Hewitt, J., Greening, G.E., Jin, M., Duan, Z.L., Lucero, Y., O’Ryan, M., Hoelme, M., Schreier, E., Ratcliff, R.M., White, P.A., Irtani, N., Reuter, C., Koopmans, M., 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* 200 (5), 802–812. <https://doi.org/10.1093/infdis/jin127>.
- Slozdra, J.A.M., Bandeira, R.S., Oliveira, D.S., dos Santos, L.F.P., Gabbay, Y.B., 2017. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982–2011) comprehensive study with children from northern Brazil. *PLoS One* 12 (6), e0178909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178909>.
- Tan, M., Jin, M., Xie, H., Duan, Z., Jiang, X., Fang, Z., 2008. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J. Med. Virol.* 80 (7), 1296–1301. <https://doi.org/10.1002/jmv.21200>.
- Teunis, F.F., Sukhrie, F.H., Vennema, H., Bogerman, J., Beersma, M.F., Koopmans, M.P., 2015. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol. Infect.* 143 (8), 1710–1717. <https://doi.org/10.1017/S095026881400274X>.
- Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K.O., Johansson, H., Wainfrid, C., Larson, C., Svensson, L., 2005. A homozygous nonsense mutation (428C→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GII) infections. *J. Virol.* 79 (24), 15351–15355. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15351-15355.2005>.
- Tohma, K., Lepore, C.J., Ford-Siliz, L.A., Parra, G.I., 2017. Phylogenetic analyses suggest that factors other than the capsid protein play a role in the epidemic potential of GII.2 norovirus. *mSphere* 2. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00187-17>. e00187-17.
- Tohma, K., Lepore, C.J., Gao, Y., Ford-Siliz, L.A., Parra, G.I., 2019. Population genomics of GII.4 noroviruses reveal complex diversification and new antigenic sites involved in the emergence of pandemic strains. *mBio* 10 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02202-19>. e02202-19.
- Trang, N.V., Chotsy, M., Nakagomi, T., Chinh, N.T.M., Doan, Y.H., Yamashiro, T., Bryant, J.E., Nakagomi, O., Anh, D.D., 2015. Determination of cut-off cycle threshold values in routine RT-PCR assays to assist differential diagnosis of norovirus in children hospitalized for acute gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.* 143 (15), 3292–3299. <https://doi.org/10.1017/S095026881500059X>.
- van Beek, J., de Graaf, M., Al-Helbi, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botkeidoren, N., Brytting, M., Busca, J., Calverton, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Gutx, S., Hewitt, J., Irtani, N., Jin, M., Johns, R., Lederer, I., Mars, J., Martella, V., Mazzola, L., McAllister, C., Niendoef, S., Nisoses, H.G., Podkocin, A.T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, L.D., Reuter, G., Tuttle, G., Kronsman, A., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., NoroNet, 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network (2018). *Lancet Infect. Dis.* 18 (5), 545–553. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30059-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30059-8).
- Voga, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D., Vinje, J., 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 52, 147–155. <https://doi.org/10.1128/JCM.02680-13>.
- Vicentini, F., Demadi, W., Gomes, Y.M., Rose, T.L., Ferreira, M.S.R., Le Moulec-Vaittye, B., Le Pendu, J., Leite, J.P.C., Magostovich, M.P., Spano, L.C., 2013. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo state, Brazil. *PLoS One* 8 (7), e69348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069348>.
- Vinje, J., 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 53, 373–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>.