

ROTAVÍRUS EM BELÉM DO PARÁ, BRASIL (ESTUDO PILOTO)

Alexandre C. LINHARES (1), Francisco P. PINHEIRO (1), Christel SCHMETZ (2), Gunther MÜLLER (2), Dietrich PETERS (2) e Ronaldo B. FREITAS (1)

RESUMO

Utilizando-se as técnicas de microscopia eletrônica e ELISA, rotavírus foram detectados em 4 (16%) de 25 espécimes fecais de crianças portadoras de quadro diarréico agudo. Em 2 desses 4 materiais, apenas rotavírus foram detectados, sem quaisquer outros enteropatógenos concomitantes; nos outros dois foram observadas associações de rotavírus com *Klebsiella* sp em um caso e com cogumelos em brotamento em um outro.

INTRODUÇÃO

Após a descoberta de BISHOP & col.², na Austrália, em 1973, de um agente viral associado à gastroenterite infantil, e depois da observação de que o vírus pode ser facilmente detectado nas fezes^{7,8}, inúmeras publicações surgiram na literatura assinalando a sua presença em diversos países. O citado agente, que tem recebido denominações como reovírus-like, duovírus e em particular rotavírus, já foi encontrado em diferentes regiões, principalmente nas de clima temperado, onde tem sido pesquisado com mais frequência^{1,2,3,4,7,8} o que sugere a sua distribuição universal. A maior incidência de diarreia por esse vírus ocorre no grupo etário de 0 a 5 anos (4) e, em alguns países, foi assinalado nas fezes de até 73% de crianças diarréicas⁴. Nos países de clima temperado, tais infecções ocorrem em maior número no inverno.

Considerando a relevante importância desse agente como causa de gastroenterite infantil, decidimos levar a efeito investigações preliminares sobre a associação dos rotavírus com as diarreias infantis em Belém do Pará. Paralelamente, investigou-se a participação de outros vírus, cultiváveis em linhagens celulares e/ou patogênicos para camundongos recém-nascidos,

bem como a de bactérias e parasitos enteropatógenicos.

O presente relato descreve os achados finais desse estudo, que já havia sido objeto de comunicação anterior¹⁰ que apresentou os resultados preliminares.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de abril a outubro de 1975 foram examinadas 25 crianças na faixa etária de 0 a 5 anos, nativas de Belém, Pará, portadoras de quadro diarréico agudo. Esses pacientes recebiam assistência no ambulatório de Pediatria da Santa Casa do Pará e provinham de famílias de baixo nível sócio econômico. Foram freqüentes os quadros de desnutrição associados à patologia gastrointestinal.

De cada paciente colheu-se uma amostra de fezes que foi imediatamente submetida aos exames bacteriológicos e parasitológicos. O restante foi estocado a -20°C, em frigoríficos, até serem processados os exames virológicos, inclusive a pesquisa de rotavírus. Esta foi feita através de microscopia eletrônica (ME) e do método "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELI-

(1) Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviços de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Belém, Pará, Brasil
(2) Institut Bernhard-Nocht, Hamburg — Germany

SA). Para o exame através da M.E. foram feitas suspensões de fezes a 10% em solução salina fisiológica e, em seguida, centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos; o sobrenadante foi então centrifugado a 7.000 rpm durante 30 minutos e, finalmente, esse último sobrenadante submetido a uma centrifugação de 50.000 rpm durante 2 horas em ultracentrífuga Beckman, modelo L, usando-se rotor de ângulo fixo. O sedimento era ressuspensão em 0,2 ml de água destilada e a seguir, uma gota dessa suspensão era depositada sobre um "grid", ao qual, depois de seco, se adicionava uma gota de solução a 2% de tungstato duplo de sódio e silício (SST), usada como contraste negativo. Após a remoção do excesso de líquido o "grid" era então examinado para a detecção de partículas de rotavírus em microscópio eletrônico modelo Philips 301.

O método de ELISA para detecção de antígeno de rotavírus nas fezes foi basicamente o descrito por VOLLER & col.¹⁸. Orifícios de uma microplaca de poliestireno (Cooke Laboratories) foram preenchidos com 200 µl de soro de coelho anti-rotavírus bovino na concentração de 10 µg/ml, em solução tampão de carbonato-bicarbonato pH 9,6, incubando-se 2 horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. A placa foi a seguir lavada três vezes, 3 minutos cada, com solução tamponada de fosfato (P.B.S.) contendo 0,5% de Tween 20 (Sigma 104). Adicionaram-se, então, 200 µl de suspensão de fezes a 2% em P.B.S.-Tween, previamente clarificadas através de baixa centrifugação, em centrifuga refrigerada, aos orifícios da microplaca, sendo dois para cada amostra, incubando-se 4 horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. Lavou-se novamente com P.B.S. — Tween e se acrescentaram, a seguir, 200 µl de conjugado enzimático de soro de coelho anti-rotavírus bovino com a peroxidase (Sigma fração IV) em cada orifício, incubando-se por uma noite a 4°C em câmara úmida. A seguir, após 3 lavagens com P.B.S. — Tween, adicionaram-se, a cada orifício, 200 µl de solução contendo 34 mg de ortofenileno-diamino (O.P.D.) para cada 100 ml de tampão de citrato contendo peróxido de hidrogênio (30 vol.) na concentração final de 1/5.000. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se, a cada orifício, 100 µl de solução 4M de ácido sulfúrico. Nas amostras positivas observou-se coloração

marron, sendo as medidas de densidade óptica feitas em espectrofotômetro Dynatech, usando-se filtro de 492 nm. Foram usadas sistematicamente, como controles, uma suspensão de fezes contendo antígeno de rotavírus e uma outra reconhecidamente negativa quanto à presença desse agente. Os valores de densidade óptica iguais a pelo menos duas vezes o do controle negativo foram indicativos de positividade.

Duas linhagens celulares, a HEp2 e a Vero (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*) foram utilizadas para as tentativas de isolamento de vírus a partir das amostras fecais, bem como camundongos recém-nascidos inoculados por via intracerebral. Os enterovírus isolados foram identificados através do uso de "pools" de antissoros de referências (Lim & Beniesch-Melnick) e de antissoros específicos para echovírus e coxsackievírus, fornecidos pelo National Institute of Health (N.I.H.), Bethesda, Maryland, U.S.A.

O isolamento de bactérias foi feito diretamente em placas de E.M.B. ágar, SS ágar e no meio de enriquecimento de tetrionato de Kauffman e deste, em SS ágar, após 24 horas de incubação a 37°C. As caracterizações bioquímica e sorológica das enterobactérias isoladas foram baseadas no método recomendado por EDWARDS & EWING⁵.

Todas as amostras fecais foram ainda submetidas ao exame direto para a verificação de parasitas e fungos intestinais.

RESULTADOS

A Tabela I mostra a incidência de agentes virais, bacterianos e parasitários em 25 crianças portadoras de quadro diarréico agudo. Rotavírus foram detectados em 4 (16%) dos 25 espécimes dos doentes. Nove (36%) enterovírus, sendo 3 echovírus e 6 coxsackievírus, foram isolados a partir dos 25 materiais das crianças diarréicas. Entre as bactérias não representativas da flora intestinal normal, isoladas do grupo diarréico, salientam-se *Shigella* em 1 (4%), *Klebsiella* sp em 7 (28%), *Enterobacter* sp em 2 (8%), *Pseudomonas* sp em 1 (4%) e *Staph. aureus* em 1 (4%) caso. Ainda se destacaram a ocorrência de *Giardia lamblia* em 2 (8%) dos casos e de cogumelos em brotamento em 7 (28%) deles.

A Tabela II reúne os 4 casos positivos para rotavírus, os métodos empregados para sua de-

T A B E L A I

Incidência de agentes virais, bacterianos e parasitários em 25 casos de diarreia infantil. Santa Casa do Pará, no período de abril a outubro de 1975.

Agentes pesquisados	N.º positivos	% positivos
Rotavírus	4	16
Enterovírus (1)	9	36
Shigella (2)	1	4,0
Klebsiella sp	7	28,0
Enterobacter sp	2	8,0
Pseudomonas sp	1	4,0
Staph. aureus	1	4,0
G. lamblia	2	8
A. lumbricoides	6	24
T. trichiurus	5	20
Ancilostomídeos	2	8
Cogumelos em brotamento	7	28

- (1) No grupo diarreico 3 echovírus (1 sorotipo 19 e 2 sorotipos 20), 6 coxsackievírus (1 sorotipo A₂, 1 sorotipo A₉, 2 sorotipos B₃ e 2 sorotipos B₅)
 (2) Pertencente os subgrupo D (Sh. sonnei)

tecção e os resultados obtidos, bem como a concomitância de outros patógenos intestinais. Houve concordância entre os resultados obtidos por M.E. e ELISA com respeito a 3 amostras examinadas por ambos os métodos. Em dois casos (Reg. 13.436 e Reg. 13.465), rotavírus foram os únicos patógenos detectados e, nos outros dois, observaram-se associações desses vírus com *Klebsiella* sp em um caso, e com cogumelos em brotamento em outro.

Na Fig. 1 observam-se partículas com características morfológicas semelhantes às descritas para os rotavírus, ou seja, duplo capsídeo de 65-70 nm de diâmetro e cerne de 33 nm de diâmetro, nas fezes de um dos 4 casos positivos (Reg. 13.436).

A Tabela III reúne os 4 casos positivos para rotavírus com os sinais e sintomas obser-

T A B E L A II

Comparação entre os métodos empregados para detecção de rotavírus nos 4 casos positivos e associação com outros patógenos intestinais

N.º de Registro	Pesquisa de rotavírus		Outros patógenos		
	M.E.	ELISA	Vírus	Bactérias	Parasitas
13.361	+	+	—	<i>Klebsiella</i> sp	—
13.436	+	+	—	—	—
13.439	+	+	—	—	Cogumelos em brotamento
13.465	+	NT	—	—	—

NT = Não testado
 + = Positivo
 — = Negativo

vados por ocasião do exame clínico a que eram submetidas as crianças, quando do atendimento. Diarreia mucosa e cólicas foram registradas em todos os pacientes. A febre só foi observada em um caso, enquanto que a presença de sangue nas fezes e vômitos foi assinalada em dois pacientes.

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sobre a ocorrência de rotavírus tem sido feita em regiões de clima temperado, e tem revelado a associação do agente, em proporção significativa, às gastroenterites agudas em crianças com idade inferior a 5 anos. Por conseguinte, os nossos achados, referentes a uma região tropical onde o agente tem sido pesquisado relativamente poucas vezes^{6,15,17,19},

vêm contribuir para o conhecimento de sua distribuição geográfica.

A frequência (16%) com que os rotavírus foram detectados nas fezes de crianças portadoras de gastroenterite por nós estudadas em Belém, apresenta similaridade ou não com a registrada em outras regiões tropicais. Assim, WYATT & col.¹⁹, na Guatemala, observaram a associação de rotavírus em 26 (14,2%) dos 183 episódios de diarreia exibidos por um grupo de 24 crianças, nos três primeiros anos de vida. Por outro lado, ESPARZA & col.⁶ constataram a presença de rotavírus em 76% de 26 crianças venezuelanas situadas na faixa etária de 0 a 2 anos, acometidas de gastroenterite aguda. Essas marcantes variações nos percentuais de associação dos rotavírus aos quadros diarreicos

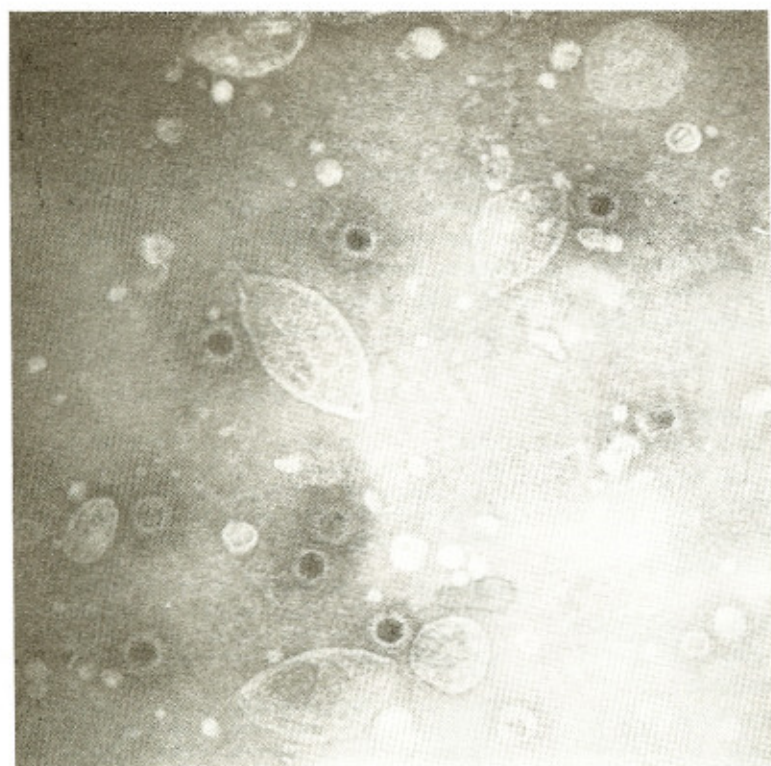


Fig. 1 — Rotavírus nas fezes de paciente com gastroenterite infantil. Registro 13.436 (100.000 X).

TABELA III

Manifestações clínicas apresentadas pelos 4 casos de pacientes positivos para rotavírus

Manifestações clínicas	Registros			
	13.361	13.436	13.439	13.465
Muco nas fezes	+	+	+	+
Sangue nas fezes	-	-	+	+
Febre	-	-	+	-
Cólicas	+	+	+	+
Vômitos	-	+	-	+

+ = Presença
- = Ausência

observadas nos estudos acima, podem correr por conta de diversos fatores. É possível que características inerentes às condições sócio-econômicas de cada grupo tenham influenciado nos resultados. No entanto, as diferenças registradas entre esses trabalhos são de difícil interpretação uma vez que não se dispõem nos mesmos, de amostras de crianças selecionadas ao acaso.

De qualquer modo, além do nosso achado constituir o primeiro registro do agente da Amazônia é de interesse observar a associação dos rotavírus com outros agentes potencialmen-

te capazes de provocar gastroenterite aguda. Com efeito, em 2 de nossos 4 casos, em cujas fezes se detectaram rotavírus, demonstrou-se tal associação, sendo uma com *Klebsiella* sp e a outra com cogumelos em brotamento. Assinala-se, ainda, que em 15 (71,4%) dos 21 casos restantes foi possível identificar-se agentes infecciosos ou parasitários por quadros de gastroenterite aguda. Reveste-se também de interesse o isolamento de enterovírus de 36% (9/25) das crianças diarreicas, sendo pertinente lembrar que alguns outros^{12,14} admitem a participação de certos sorotipos de echovírus e de coxsackievírus nos quadros de diarreia infantil.

Convém assinalar a concordância de 100% observada entre os resultados obtidos pelos métodos de ELISA e M.E., empregados em nossos estudo, para a pesquisa de rotavírus. Essas técnicas são dotadas de reconhecida sensibilidade para a detecção de rotavírus nas fezes^{13,20} embora alguns Autores^{9,16} destaquem o método da contra-imuno eletro-osmoforese como outro recurso prático e sensível de diagnóstico das infecções por rotavírus.

Ao exame clínico, todos os 4 casos positivos para rotavírus apresentavam cólicas e diarreia

mucosa, na ocasião de atendimento. Apenas 1 caso exibiu hipertemia, o que diverge da observação de outros Autores³, que consideram a febre como um dos sinais mais proeminentes no curso das infecções por rotavírus. Ressalte-se que, dos 4 casos positivos para o agente em nosso estudo, o paciente febril foi o que apresentou evolução mais severa. Assinale-se, ainda, que dois pacientes apresentaram diarreia sanguinolenta, sendo que em apenas um deles ocorreu associação com outro enteropatógeno (cogumelos em brotamento).

Todas as crianças com gastroenterite do presente estudo foram submetidas a tratamento através de re-hidratação oral ou parenteral e de antibioticoterapia convencional, bem como à correção alimentar. A evolução dos 25 casos foi favorável, não sendo registrados óbitos.

Estudos mais recentes revelaram a presença de rotavírus em duas outras áreas da Amazônia. Uma foi a aldeia Tiriyo, localizada ao norte do Pará, onde o agente foi responsável por um surto explosivo de diarreia que acometeu 70% dos silvícolas, adultos e crianças¹¹. A outra foi a cidade de Santarém, igualmente no Pará, onde o agente foi encontrado em associação com *Shigella* subgrupo B, durante um surto de diarreia que ali ocorreu em novembro de 1977 (LINHARES, A.C., dados não publicados). Esses dados sugerem, pois, a ampla dispersão do agente na Amazônia, do que decorre a necessidade de se levar a efeito um estudo abrangendo um número maior de crianças, a fim de que sejam delineadas as características epidemiológicas e clínicas da virose em nossa região. É importante, também, determinar quais os tipos antigênicos de rotavírus prevalentes na Amazônia.

SUMMARY

Rotavirus in Belém do Pará, Brazil

Rotaviruses were detected by electron microscopy and ELISA in 4(16%) of 25 faecal samples from children with acute diarrhoea. In two specimens, no other enteropathogens than rotavirus were detected; rotaviruses were associated with *Klebsiella* sp, and with fungi in two other cases.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários da Seção de Vírus do Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo isolamento e identificação dos enterovírus. Ainda estamos particularmente gratos às Seções de Bacteriologia e Parasitologia do IEC pela pesquisa dos enteropatógenos que não vírus. Ao Dr. Dennis Bidwell, do Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, Londres, Inglaterra, pela orientação nos testes de ELISA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIRCH, C. J.; LEWIS, F. A.; KENNETT, M. L.; HOMOLA, M.; PRITCHARD, H. & GUST, I. D. — A study of the prevalence of rotavirus infection in children with gastroenteritis admitted to an Infectious Diseases Hospital. *J. Med. Virol.* 1: 67-69, 1977.
2. BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H. & HUCK, B. J. — Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283, 1973.
3. CARR, E. M.; MCKENDRICK, D. W. & SPIRIDAKIS THRASYVOULOS — The clinical features of infantile gastroenteritis due to rotavirus. *Scand. J. Infect. Dis.* 8: 241-243, 1976.
4. DAVIDSON, G. P.; TOWNLEY, R. R. W.; BISHOP, R. F. & HOLMES, I. H. — Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 242-251, 1975.
5. EDWARDS, P. R. & EWING, H. W. — Identification of enterobacteriaceae. Third edition. London, Burgess Publishing Company, 1972.
6. ESPARZA, J.; VIERA DE TORRES, B.; PINERO, A.; CARMONA, F. O. & MAZZALI DE ILJA, R. — Rotaviruses in Venezuelan children with gastroenteritis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 148-151, 1977.
7. FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S. & DAVIES, H. — Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497, 1973.
8. FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S. & DAVIES, H. — Diagnostic electron microscopy of faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J. Clin. Path.* 27: 603-614, 1974.
9. GRAUBALLE, P. C.; GENNER, J.; MEYLING, A. & HORNSLETH, A. — Rapid diagnosis of rotavirus infections: comparison of electron microscopy and immuno-electro-osmophoresis for detection of rotavirus in human infantile gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 35: 203-218, 1977.
10. LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G. & DIETRICH, P. — Rotavírus em Belém do Pará — Brasil (Nota prévia). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 278, 1977.

11. LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B. & GABBAY, Y. B. — Surto de gastroenterite causada por rotavírus entre índios da aldeia Tiriyo — Pará. *Boletim Epidemiológico da F. SESP*. Volume (ano) XI n.º 2; semanas 3 e 4, 1979.
12. MELNICK, J. L. — Echoviruses. In: Horsfall & Tamm, ed. *Viral and Rickettsial Infectious of Man*, 1970, pp. 260-264.
13. MIDDLETON, P. J.; PETRIC, M.; HERRIT, C. M.; SZYMANSKY, M. T. & TAM, J. S. — Counter-immuno-electro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J. Clin. Path.* 29: 191-197, 1976.
14. RAMOS ALVAREZ, M. & OLARTE, J. — Diarrhoeal diseases of children. The occurrence of enteropathogenic viruses and bacteria. *Am. J. Dis. Child.* 107: 218-231, 1964.
15. SCHOUB, B. D.; LECATSAS, G. & PROZESKY, O. W. — Antigenic relationships between human and simian rotaviruses. *J. Med. Microbiol.* 10: 1-16, 1976.
16. SPENCE, L.; FAUVEL, M.; BOUCHARD, S.; BABIUK, L. & SAUNDERS, J. R. — Test for reovirus-like agent. *Lancet* ii: 322, 1975.
17. SPENCER, H. C.; WELLS, J. C.; GARY, G. W.; SONDY, J.; PUHR, N. D. & FELDMAN, R. A. — Diarrhoea in a non-hospitalized rural Salvadoran population: The role of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 246-253, 1980.
18. VOLLER, A.; BIDWELL, D. E. & BARTLETT, A. — Enzyme immunoassays in diagnostic Medicine: theory and practice. *Bull. World Health. Organ.* 53: 55-65, 1976.
19. WYATT, R. G.; YOLKEN, R. H.; URRUTIA, J. J.; MATA, L.; GREENBERG, H. B.; CHANOCK, R. M. & KAPIKIAN, A. Z. — Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infants and young children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 325-328, 1979.
20. YOLKEN, R. H.; KIM HYUM WHA; CLEM, T.; WYATT, R. G.; CHANOCK, R. M.; KALICA, A. R. & KAPIKIAN, A. Z. — Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 6: 263-267, 1977.

Recebido para publicação em 23/6/1981.