

A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA IDENTIFICAÇÃO DE ROTAVIRUS HUMANO *

J. A. N. Candeias **
M. L. Ráczy **
José Carlos Breviglieri ***
Cornélio P. Rosenberg ****

RSPUB9/520

CANDEIAS, J. A. N. et al. *A reação de fixação do complemento na identificação de rotavirus humano.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 14:420-4, 1980.

RESUMO: Após a eliminação da anticomplementaridade, foi utilizada a reação de fixação do complemento na identificação de rotavirus em 134 amostras de fezes de crianças até um ano de idade, com quadros diarréicos agudos. A percentagem total de positividade foi de 28,7% com percentagens mais elevadas de casos positivos nos grupos etários de 6 meses a 1 ano de idade.

UNITERMOS: Rotavirus. Anticorpos fixadores de complemento. Diarréia infantil.

INTRODUÇÃO

Os trabalhos de Bishop e col.³, Flewett e col.¹¹, Middleton e col.¹⁹ e Kapikian e col.¹³ estabeleceram a relação etiológica entre os rotavírus e determinados quadros de gastroenterites infantis. Eventualmente são descritos quadros diarréicos, em adultos, com a mesma etiologia ^{4,12,16,21,27}.

Dentre a multiplicidade de métodos utilizados para a identificação de rotavírus humanos ^{1,5,6,14,22,23,25}, a reação de fixação do complemento, muito embora constituísse um método de simples execução, tinha seu uso limitado pela elevada freqüência com que os extratos fecais se mostravam anti-

complementares ¹⁵. Recentemente, Zissis e col.²⁸ descreveram um método para eliminação da anticomplementaridade dos extratos fecais, com o que passou esta reação a ter mais amplas possibilidades de utilização rotineira, na identificação de rotavírus.

No presente trabalho apresentam-se os resultados obtidos na identificação de rotavírus em extratos fecais provenientes de crianças com gastroenterite infantil, tendo-se usado a reação de fixação do complemento.

* Pesquisa financiada pelo Departamento de Assistência à Infância e Maternidade da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de São Paulo.

** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

*** Da Pediatria Clínica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP — Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 — 05443 — São Paulo, SP — Brasil.

**** Do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública da USP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de fezes

As 134 amostras de fezes obtidas de crianças com quadros diarréicos agudos foram tratados conforme técnica descrita por Zissis e col.²⁸ e conservadas a -20°C, para posterior utilização. No momento em que se submeteram os extratos fecais a exame, foram estes adicionados de soro fetal bovino, previamente inativado a 56°C, durante 30 minutos, segundo a técnica descrita por aqueles autores. Só foi possível aproveitar 122 amostras, por não se ter conseguido retirar a anticomplementaridade de 12 amostras, o que representa uma perda percentual de 8,9%, em relação ao total de amostras colhidas.

Soros anti-rotavírus

Foram usados soros humanos com anticorpos fixadores de complemento para rotavírus com títulos maiores ou iguais a 64, na diluição de 1:16.

Reação de fixação do complemento

Para a execução desta reação seguiu-se a técnica estabelecida pelo United States Public Health Service²⁴. Trata-se fundamentalmente, de uma microtécnica para volumes de 25 μ l que utiliza hemácias de carneiro a 2,8%, uma dose ótima de hemolisina a 5 unidades de complemento C'H₅₀. Foi inicialmente feita uma triagem para identificação dos extratos fecais positivos na diluição a 1:2 (25 μ l do extrato misturados com 25 μ l de soro fetal bovino, previamente inativado); os extratos positivos foram subsequentemente titulados desde a diluição a 1:2 até à diluição a 1:64. Depois de adicionados o soro anti-rotavírus e o complemento, as microplacas foram incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas, em câmara úmida. Antes de se adicionar o sistema hemolítico, passou a incubação a ser feita, por 20 min., em estufa a 37°C; após a adição do sistema hemolítico man-

teve-se a incubação a 37°C por um período complementar de 60 min., depois do que se transferiram as placas para ambiente a 4°C, onde foram mantidas durante 3 h. Terminada esta última incubação procedeu-se à leitura dos resultados, por comparação com um padrão de cores, também preparado em microplaca. Considerou-se, como título, a recíproca da maior diluição do extrato fecal em que a percentagem de hemólise não ultrapassava 30%, desde que não ocorresse anticomplementaridade e respeitadas as percentagens de hemólise previstas para os controles.

RESULTADOS

Na Tabela apresentam-se os resultados obtidos na identificação de rotavírus em extratos fecais de crianças portadoras de quadros diarréicos agudos.

A análise da distribuição dos títulos fixadores do complemento, obtidos nos extratos fecais positivos para rotavírus, evidencia que 54,3% apresentavam títulos compreendidos entre 2 e 4; títulos maiores do que 4 ocorreram em 45,7% dos casos positivos. Em termos da positividade por grupo etário, os dados permitem estabelecer que 17,6% (15/85) das crianças com idade inferior a 6 meses deram resultados positivos; no grupo de 6 meses a menos de 10 meses encontram-se 59,1% (13/22) de casos positivos; 46,6% (7/15) de casos positivos foram encontrados nos grupos etários compreendidos entre 10 meses e 12 ou mais meses.

DISCUSSÃO

O exame por microscopia eletrônica de extratos fecais obtidos de crianças com gastroenterite aguda tornou evidente que alguns vírus tais como adenovírus^{10,20}, coronavírus⁷, astrovírus, mini-reovírus, parvovírus e rotavírus¹⁷ podem ser considerados como agentes etiológicos de quadros daquela natureza. Dentre esta já longa

TABELA
Identificação de rotavírus nas fezes.

Idade (meses)	Número de casos*	Títulos fixadores do C'								Positividade	
		2	2	4	8	16	32	64	Nº	%	
0 — 2	34	29	2	1	1	1	0	0	5	14,7	
2 — 4	30	25	1	2	1	1	0	0	5	16,6	
4 — 6	21	16	1	2	0	2	0	0	5	23,8	
6 — 8	11	5	0	2	1	2	1	0	6	54,5	
8 — 10	11	4	2	1	1	3	0	0	7	63,6	
10 — 12	7	4	1	1	1	0	0	0	3	42,8	
> 12	8	4	1	2	1	0	0	0	4	50,0	
Total	122	87	8	11	6	9	1	0	35	28,7	

* De um total de 134 amostras só puderam utilizar-se 122 por não ter sido possível retirar a anticomplementaridade de 12 amostras.

série de vírus, os rotavírus surgem como relacionados com a etiologia de mais da metade de todos os casos de gastroenterites infantis que ocorrem durante os meses de inverno⁸. Nos chamados países em desenvolvimento as gastroenterites por rotavírus parecem constituir-se num quadro de relativa freqüência e, provavelmente, de marcada importância^{1,2,6,9,15,22,26}. Um diagnóstico laboratorial rápido e simples das gastroenterites por rotavírus adquire, assim, um interesse muito particular. A identificação através da microscopia eletrônica e da imunoeletromicroscopia é de simples execução podendo examinar-se, rapidamente, um número relativamente elevado de espécimes, no entanto, o custo elevado deste tipo de exames é restritivo para um grande número de laboratórios. Do mesmo modo, a complexidade e o custo das técnicas imunoenzimáticas e de radioimunoensaio²⁵ constituem fatores limitantes de seu uso, muito embora os resultados obtidos com as mesmas sejam de particular precisão, o que muito justificaria seu uso generalizado. Restam as técnicas de fluorescência em cultura celular^{2,5}, de contraímunoeletroforese^{6,18,23} e de fixação do complemento²³

que pela sua simplicidade e baixo custo se tornam mais acessíveis. A contraímunoeletroforese mostra-se uma técnica econômica com resultados comparáveis aos da microscopia eletrônica, o mesmo ocorrendo com a fixação do complemento, em que os inconvenientes da anticomplementaridade podem ser contornados com a simples adição de soro fetal bovino²⁸. Nossos resultados, obtidos pela fixação do complemento, são comparáveis aos conseguidos, em trabalho anterior, usando a contraímunoeletroforese⁶. Estes resultados concordam ainda com os conseguidos por Zissis e col.²⁸, em termos da possibilidade de avaliar, quantitativamente, a eliminação de rotavírus e quanto à freqüência dos títulos encontrados. No grupo estudado por aqueles autores 80% dos casos positivos se distribuem entre os títulos de 4 e 32, enquanto nossas observações atingiram uma percentagem de 77,1%, na mesma faixa de títulos. Conforme os dados da Tabela, os casos positivos identificados em nosso estudo distribuem-se principalmente pelos títulos 2 e 4 (54,3%) e 8 e 16 (42,8%); só um caso apresentou título 32 (2,8%). Cálculo semelhante feito com os dados de Zissis e col.²⁸ dá, para

aqueles faixas de títulos, valores percentuais de 30,4%, 42,8% e 16,1%; esses autores obtiveram ainda 10,7% de resultados maiores que 32. A não obtenção em nossos

resultados de títulos tão elevados pode estar relacionada com as diferenças entre as técnicas de fixação de complemento utilizadas.

RSPUB9/520

CANDEIAS, J. A. N. et al. [The complement fixation test in the identification of human rotavirus]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 14:420-4, 1980.

ABSTRACT: After eliminating the anticomplementarity of the fecal extracts, complement fixation was used to detect human rotavirus in the stools of 35 (28.7%) out of 122 one-to twelve-month-old children with acute gastroenteritis. Infection was higher in the 6-to 12-month-old children.

UNITERMS: Rotavirus. Complements fixation tests. Diarrhea, infantile.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDACCI, E. R. et al. Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 13:47-53, 1979.
- BANATVALA, J. E. et al. In-vitro detecção de human rotaviruses. *Lancet*, 2: 821, 1975.
- BISHOP, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-3, 1973.
- BONDSCORFF, C. H. et al. Rotavirus associated with acute gastroenteritis in adults. *Lancet*, 2:423, 1976.
- BRYDEN, A. S. et al. Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J. med. Microbiol.*, 10:121-5, 1977.
- CANDEIAS, J. A. N. et al. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:99-103, 1978.
- CAUL, F. O. & CLARK, S. K. R. Coronavirus propagated from patients with non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2: 953-4, 1975.
- DAVIDSON, G. P. et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, 1:242-6, 1975.
- ESPARZA, J. et al. Rotavirus in Venezuelan children with gastroenteritis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 26:148-51, 1977.
- FLEWETT, T. H. et al. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, 1:4-5, 1975.
- FLEWETT, T. H. et al. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2:1497, 1973.
- GOMEZ-BARRETO, J. et al. Occurrence of "viral particles" in diarrhea (Letter). *New Engl. J. Med.*, 292:1297, 1975.
- KAPIKIAN, A. Z. et al. Reovirus like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*, 185:1049-53, 1974.
- KAPIKIAN, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections non-bacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10:1075-81, 1972.
- LOMBARDI, G. H. et al. Virus of infantile gastroenteritis. *Lancet*, 2:131, 1975.

16. MEURMAN, O. H. & LAINE, M. J. Rotavirus epidemic in adults (Letter). *New Engl. J. Med.*, 296:1298-9, 1977.
 17. MIDDLETON, M. D. et al. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Amer. J. Dis. Child.*, 131:733-7, 1977.
 18. MIDDLETON, P. J. et al. Counter-immunoelectroosmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus antigen and antibody. *J. clin. Pathol.*, 29:191-7, 1976.
 19. MIDDLETON, P. J. et al. Orbivirus acute gastroenteritis in infancy. *Lancet*, 1: 1241-4, 1974.
 20. MOFFET, M. L. et al. Epidemiology and etiology of severe infantile diarrhea. *J. Pediatr.*, 72:1-14, 1968.
 21. ORSTAVIK, I. et al. Rotavirus-associated gastroenteritis in two adults probably caused by virus reinfection. *Scand. J. infect. Dis.*, 8:277-8, 1976.
 22. SPENCE, L. et al. Test for reovirus-like agent (Letter). *Lancet*, 2:322, 1975.
 23. TUFVESSON, B. & JOHNSON, T. Immunoelectroosmophoresis for detection of reo-like virus: methodology and comparison with electron microscopy. *Acta pathol. microbiol. scand., Sect. B*, 84:225-8, 1976.
 24. UNITED STATES PUBLIC HEALTH SERVICE. *Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest*. Washington, D. C., U.S. Government Printing Office, 1968. (Publ. Hlth monogr., 77)
 25. YOLKEN, R. H. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*, 2:263-6, 1977.
 26. YOLKEN, R. H. et al. Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *New Engl. J. Med.*, 299: 1156-61, 1978.
 27. ZISSIS, G. et al. Child-mother transmission of rotavirus? (Letter). *Lancet*, 1: 96, 1976.
 28. ZISSIS, J. P. et al. Routine diagnosis of human rotaviruses in stools. *J. clin. Pathol.*, 31:175-8, 1978.
- Recebido para publicação em 17/04/1980*
Aprovado para publicação em 23/06/1980