

ELETROFERÓTIPOS DE ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS COM E SEM QUADROS DE GASTROENTERITE

Cristovão Costa*
José Alberto Neves Candeias**
Edna Lillian Lira Capeletti**

COSTA, C. et al. Eletroferótipos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24 : 152-5, 1990.

RESUMO: Com o objetivo de definir os tipos eletroferóticos de rotavírus identificados em material fecal de crianças com e sem quadros de gastroenterite, foram analisadas mil amostras de fezes, obtidas de dois grupos infantis, na faixa etária de 0 a 12 meses, sendo 500 amostras denominadas de "Caso" e 500 identificadas como "Controle", estas últimas obtidas de crianças sem quadros diarreicos. Encontrou-se positividade de 14,8% no primeiro grupo, com 5 eletroferótipos curtos e 11 eletroferótipos longos e, no segundo grupo, 0,8% somente com 3 eletroferótipos longos.

DESCRITORES: Rotavírus, isolamento. Gastroenterite.

INTRODUÇÃO

As gastroenterites infantis constituem um dos principais problemas de saúde pública, sendo causa de alta morbidade e mortalidade em recém-nascidos e lactentes nos países em desenvolvimento^{3,4,7}. Ocorrem, anualmente, em todo o mundo, cerca de 500 milhões de casos de diarreia, resultando direta ou indiretamente em 10 milhões de óbitos; em 1980, estimou-se que ocorreram nos países do Terceiro Mundo 8 milhões de episódios de diarreia em crianças de idade inferior a cinco anos, com cerca de 5 milhões de óbitos¹⁷.

Os rotavírus são importantes agentes etiológicos das gastroenterites agudas em animais de várias espécies¹¹. Em crianças, na faixa etária de seis meses a dois anos, tem significativa participação, isoladamente, ou associados a outros agentes de diarreias, como enterobactérias². Também em quadros diarreicos de adultos é importante a participação dos rotavírus¹⁹.

Os rotavírus possuem genoma de ARN bicatenário e dividido em 11 segmentos, que podem ser separados em gel de poliácridamida, conforme suas massas moleculares, variando estas de $2,04 \times 10^6$ a $0,23 \times 10^6$ daltons⁸. Lourenço e col.¹² propuseram o agrupamento destes segmentos em 4 aglomerados, compreendendo o aglomerado I os 4 primeiros segmentos, o II, os segmentos 5 e 6, o III, os

segmentos 7, 8 e 9 e o IV os segmentos 10 e 11. Conhecem-se hoje diferentes perfis eletroferotípicos de rotavírus isolados de espécies animais diferentes, como de cepas de rotavírus isolados da mesma espécie^{6,10,12}. O estudo do perfil genômico dos rotavírus permitiu sua divisão em 5 grupos eletroferóticos (A-E), que apresentam como característica diferentes associações dos segmentos 7, 8 e 9.¹³ Nos casos humanos consideram-se ainda dois tipos eletroferóticos definidos pelos segmentos 10 e 11 e designados por "longo" e "curto", conforme a extensão de migração daqueles segmentos no gel^{5,7,14}. Podem encontrar-se padrões com segmentos adicionais, caracterizando possíveis infecções mistas^{1,18}.

O objetivo do presente trabalho é verificar a ocorrência dos eletroferótipos de rotavírus na cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas no serviço ambulatorial de um Hospital da cidade de São Paulo, 500 amostras de fezes de crianças da faixa etária de 0 a 12 meses de ambos os sexos, com quadro clínico de diarreia, denominadas amostras CASO, e igual número de amostras de fezes de crianças sem quadro clínico de diarreia, denominadas amostras CONTROLE, no período de janeiro a dezembro de 1986.

As fezes foram colhidas em recipientes

* Departamento de Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia — Alameda Cosme Ferreira, 1756 — Caixa Postal 478 — 69011 — Manaus, AM — Brasil

** Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo — Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 — 05508 — São Paulo, SP — Brasil.

plásticos com capacidade de 100 ml, sendo mantidas a -20 °C até o início de seu processamento.

A extração do ARN viral das fezes e a eletroforese em gel de poliacrilamida foram conduzidas de acordo com a metodologia preconizada por Laemmli¹¹, com modificações introduzidas por Pereira e col.¹⁴. As fezes eram preparadas em suspensão a 10-20% em tampão Tris/HCl 0,1 M com pH a 7,3, eram homogeneizadas e clarificadas a baixa centrifugação. O sobrenadante contendo partículas virais era desproteínezado com uma combinação de fenolclorofórmio. A eletroforese do ARN foi corrida em gel de poliacrilamida a 7,5% a uma corrente constante de 20 mA por 4-5 horas em temperatura ambiente. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata com a técnica proposta por Herring e col.⁸.

RESULTADOS

Das 500 amostras de fezes de crianças com diarreia, 74 (14,8%) foram positivas e destas, 8 (1,6%) não puderam ser classificadas eletroferotipicamente; das sem diarreia, somente 4 (0,8%) foram positivas (Tabela).

Os resultados obtidos, quanto à análise dos eletroferotipos dos casos diarreicos e normais estão descritos na Tabela e Figura .

As amostras, nas quais os 11 segmentos apresentavam boa nitidez, foram alocadas nas combinações descritas por Lourenço e col.¹², com algumas modificações no grupo III, composto pelos segmentos 7, 8 e 9, que, segundo aquele autor, indicavam sempre duas situações em que cada uma das combinações IIIb, IIIc, IIIe e IIIf podiam ocorrer. Para tornar mais claros nossos achados, o grupo III foi por nós representado da seguinte maneira: IIIb₁, IIIb₂, IIIc₁, IIIc₂, IIIe₁, IIIe₂, IIIf₁, IIIf₂ e IIIg, este último já evidenciado anteriormente em São Paulo e no Pará¹⁴ (Figura).

As combinações dos grupos eletroforéticos foram representadas por uma letra maiúscula e um algarismo, sendo o 1 para o eletroferotipo longo e o

2 para os curtos, com o que se define o eletroferotipo da amostra estudada (Tabela).

DISCUSSÃO

Pereira e col.¹⁴ evidenciaram a diversidade de eletroferotipos, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pará, com prevalência do eletroferotipo longo em 68,1% dos casos; o tipo curto foi encontrado em 13% dos casos e em 18,8% não foi possível a classificação. Em Maceió, Houly e col.⁹ também evidenciaram a diversidade genômica dos

TABELA

Classificação dos eletroferotipos de 66 amostras do grupo "caso" e amostras do grupo "controle".

Tipos	Grupos eletroforéticos				Eletroferotipo	Total	%
	I	II	III	IV			
Amostra do grupo CASO							
C	c	a	d	b	A ₁	04	
U	c	b	f ₂	b	B ₁	03	
R	c	a	c ₁	b	C ₁	02	
T	c	a	e ₁	b	D ₁	01	
O	c	a	e ₂	b	E ₁	01	
Total						11	16,67
L	c	b	e ₂	a	F ₂	22	
O	c	b	e ₁	a	G ₂	17	
	c	b	g	a	H ₂	05	
O	b	b	b ₁	a	I ₂	02	
	c	b	e ₂	a	J ₂	01	
N	c	c	g	a	L ₂	01	
	b	a	e ₂	a	M ₂	01	
G	b	b	e ₂	a	N ₂	02	
	c	b	b ₂	a	O ₂	02	
O	c	b	f ₁	a	P ₂	01	
	b	b	e ₁	a	Q ₂	01	
Total						55	83,33
Amostras do grupo CONTROLE							
L							
O	c	b	e ₂	a	J ₂	01	
N	b	b	e ₂	a	N ₂	01	
G	c	b	b ₂	a	O ₂	02	
O							
Total						04	0,8

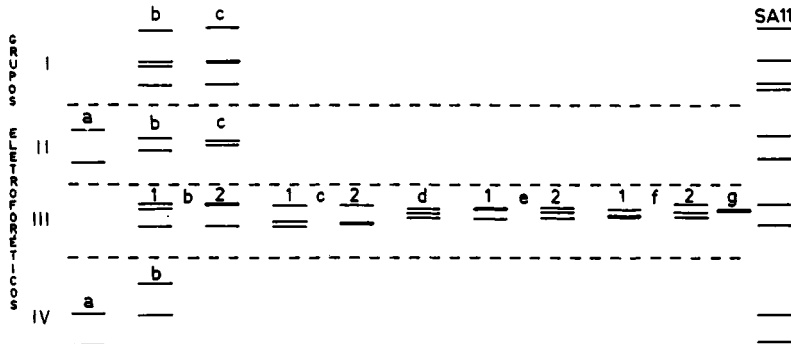


Figura — Quadro eletroferograma das amostras encontradas nos dois grupos estudados conforme diagrama de Lourenço e col.¹²

rotavírus humanos. Nas pesquisas desenvolvidas em nosso meio, os estudos sobre rotavírus humanos têm sido feitos basicamente em crianças com diarreia^{9,14}. O presente trabalho, envolvendo dois grupos de crianças da mesma faixa etária, com e sem diarreia, também evidenciou a variedade genômica dos rotavírus circulantes tanto em um quanto em outro grupo.

A Tabela discrimina os padrões eletroforéticos obtidos com as amostras de rotavírus das crianças Caso e Controle. Do total de 66 amostras positivas e classificadas pela EGPA, pelo menos 11 (16,67%) pertenciam ao eletroferótipo curto e 55 (83,33%) ao longo. Os eletroferótipos longos foram predominantes, embora dentre estes haja uma acentuada variedade nas combinações dos segmentos. Foram encontrados 22 eletroferótipos do tipo F_2 e 17 do G_2 . Entre os eletroferótipos curtos, prevaleceu o denominado A_1 , com quatro dos 11 tipos encontrados, não se encontrando tipos iguais aos descritos por Pereira e col.¹⁴, e Houly e col.⁹. Em relação aos eletroferótipos longos há algumas considerações a serem feitas para os tipos G_2 , J_2 , L_2 , I_2 e O_2 ; dos tipos G_2 e F_2 foram encontrados dois de cada um, na cidade do Rio de Janeiro e um do L_2 em São Paulo¹⁴. Em Alagoas foram encontrados oito eletroferótipos do L_2 dois do I_2 e um do O_2 ⁹.

A distribuição dos eletroferótipos do grupo Caso por zonas metropolitanas foi analisada; observando-se que a maior incidência ocorreu na zona sul, com 48 (72%) dos eletroferótipos, sendo que o eletroferótipo F_2 foi o mais encontrado, seguido do G_2 , ambos do tipo longo; o F_2 foi encontrado também nas zonas norte e leste, enquanto que o G_2 somente na norte. Na zona oeste encontrou-se o menor número de eletroferótipos. Dentre os curtos, encontram-se três dos eletroferótipos B_1 na zona sul. Não encontramos explicação para esta distribuição, a menos que se considere sua possível relação com o nível sócio-econômico e de saneamento. A zona oeste e parte da zona metropolitana sul compreende grupos populacionais economicamente mais privilegiados, enquanto na zona leste e na restante parte da zona sul, encontram-se populações menos favorecidas do ponto de vista econômico e em termos de saneamento, o que poderia explicar nossos achados para a zona sul, pelo menos.

Não devemos esquecer que a amostra estudada era formada por crianças em atendimento ambulatorial e portanto originárias de famílias com menor poder aquisitivo. É possível que haja predominância de certos eletroferótipos em ambientes de baixo saneamento.

Igualmente estudou-se a distribuição sazonal dos eletroferótipos durante o ano de 1986 sendo os tipos F_2 e G_2 os mais prevalentes, apresentando o F_2 sua maior incidência no mês de maio (outono) e o G_2 no mês de agosto (inverno), ambos do tipo longo. Dentre os tipos curtos, o A_1 , com 4 eletroferótipos, só foi encontrado nos meses de outubro e novembro. Encontrou-se somente um eletroferótipo dos designados como D_1 , E_1 , J_2 , L_2 , M_2 , P_2 e Q_2 ao longo do ano.

No grupo Controle encontraram-se em quatro amostras de fezes somente três eletroferótipos, todos eles, igualmente, do tipo longo; destes, dois foram classificados como eletroferótipos O_2 , os outros com um de cada, em J_2 e N_2 . Os eletroferótipos encontrados neste grupo também foram evidenciados no grupo Caso, dos quais os tipos J_2 e O_2 já haviam sido encontrados em crianças com diarreia^{9,13}.

A Tabela mostra o eletroferograma das amostras obtidas das crianças estudadas. Observa-se tanto no aglomerado I quanto no III a ausência do conjunto a . Neste último encontramos o conjunto g não referido por Lourenço e col.¹².

O estudo do genoma segmentado de rotavírus humanos e de outros animais vem adquirindo importante significado no estudo epidemiológico da infecção causada por estes vírus, com evidências de circulação de cepas de rotavírus com diferentes padrões eletroforéticos em surtos de diarreia infantil^{7,9,16}.

A EGPA é uma técnica que apresenta sensibilidade da ordem de 97,14%, quando comparada com o ensaio imunoenzimático e a imunomicroscopia eletrônica, tendo ainda a vantagem de detectar amostras que, não possuindo antígenos comuns do grupo A, que parece constituir a maioria dos rotavírus identificados, não são diagnosticados através dos testes de ensaio imunoenzimático¹⁵. Embora se saiba que tais variações na mobilidade eletroforética, não estão necessariamente relacionadas a sorotipos, elas fornecem importantes informações epidemiológicas¹⁵.

Dada a sua simplicidade, a eletroforese em gel de poliacrilamida permite um diagnóstico etiológico rápido do quadro diarreico, tornando assim possível interromper medicação antibiótica instituída, frente a uma suspeita de diarreia bacteriana. Constitui-se ainda em instrumento útil da vigilância epidemiológica, permitindo definir surtos epidêmicos ocasionados por diferentes tipos eletroforéticos de rotavírus, caracterizar sua origem e acompanhar sua evolução.

COSTA, C. et al. [Electropherotypes of rotavirus in children with and without gastroenteritis]. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24: 152-5, 1990.

ABSTRACT: It was defined the electropherotypes of rotavirus indentified in stools of a groups (named "case") of 500 children with diarrhea, ranging in age from 0 to 12 months. A group (named "control") of 500 children of the same age group, without diarrhea or respiratory infections, were evaluated. Humam rotavirus was detected in 14.8% of the children with diarrhea. Of the positive samples 5 had the "short" and 11 the "long" electropherotype. In the control group rotavirus was detected in 0.8% of children and all the three positive samples had "long" electropherotype.

KEYWORDS: Rotaviruses, isolation. Gastroenteritis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, M.J.; BISHOP, R.F.; SHANN, F.A. Epidemiology of rotavirus diarrhea in the higlands of Papua, New Guinea, in 1979, as revealed by electrophoresis of genome RNA. *J. clin. Microbiol.*, 17:162-4, 1983.
- BALDACCI, E.R.; CANDEIAS, J.A.N.; BREVIGLIERI, J.C.; GRISI, S.J.E. Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterites infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 13:47-53, 1979.
- BISHOP, R.F. & DAVIDSON, G.P. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, 1:149-51, 1974.
- CANDEIAS, J.A.N.; ROSENBERG, C.P.; RACZ, M.L. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarréia infantil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:99-103, 1978.
- ESPEJO, R.T.; CALDERON, E.; GONZALEZ, N.; SALOMON, A.; MARTUSCELLI, A.; ROMERO, P. Present of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico city, 1977. *J. infect. Dis.*, 139:474-7, 1979.
- ESTES, M.K.; PALMER, E.L.; OBHHEST, J.F. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 105:123-84, 1983.
- ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; DIMITROV, D.H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. med. Virol.*, 29:1-22, 1984.
- HERRING, A.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODRAS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamida gels. *J. clin. Microbiol.*, 16:473-7, 1982.
- HOULY, C.A.P.; UCHOA, M.M.M.; ZAIDAN, A.M.E.; GOMES-NETO, A.; DE OLIVEIRA, F.M.; ATHAYDE, M.A.G.; ALMEIDA, M.F.L.M.; PEREIRA, H.G. Electrophoretic study of the genome of humam rotavirus from Maceió, Brazil. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 19:33-7, 1986.
- KALICA, A.R.; SERENO, M.M.; WYATT, R.G.; MEBUS, C.A.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Comparison of humam and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. *Virology*, 87:247-55, 1978.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227:680-5, 1970.
- LOURENÇO, M.H.; NICOLAS, J.C.; COHEN, J. Study of humam rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol.*, Paris, 132E:161-73, 1981.
- PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; CHASEY, D.; McCRAE, M.A. Definitions of two new groups of atypical rotaviruses. *J. gen. Virol.*, 67:131-7, 1986.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Electrophoretic study of the genome of humam rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg.*, 90:117-26, 1983.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; SUTMOLLER, F.; LEITE, J.P.G.; FARIAS, V.; BARTH, O.M.; VIDAL, M.N.P. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), Immuno-electron microscopy (IEM) and Enzyme Immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 78:483-90, 1983.
- RODGER, S.M.; BISHOP, R.; BIRCH, C.; McLEAN, B.; HOLMES, I.H. Molecular epidemiology of humam rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. clin. Microbiol.*, 13:272-8, 1981.
- SNYDER, J.D. & MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bul. Wild Hlth Org.*, 60:605-13, 1982.
- SPENCER, E.G.; AVENDANO, L.F.; GARCIA, B.I. Analysis of rotavirus mixed electropherotypes. *Infect. Immun.*, 39:569-74, 1983.
- TAO, H.; CHANGAN, W.; ZHAOYING, F.; ZINYI, C.; XUEJIAN, C.; XIAOQUANG, L.; GUANGMU, C.; HENLI, Y.; TUNGXIN, C.; WEIWE, Y.; SHUASEN, D.; WEICHENG, C. Waterborne outbreak of rotavirusdiarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, 1:1139-42, 1984.

Recebido para publicação em 27/9/1989.
Aprovado para publicação em 23/11/1990.