

## OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS E ADENOVÍRUS EM AMOSTRAS FECALIS DE CRIANÇAS COM GASTREENTERITE, NA CIDADE DE GOIÂNIA

Divina das Dores P. Cardoso<sup>1</sup>, Willia Marta E.D. de Brito<sup>1</sup>,  
Regina Maria Bringel Martins<sup>1</sup>, Elliott W. Kitajima<sup>2</sup>,  
Marieta P. M. Souza<sup>1</sup>, Aristides José Barbosa<sup>1</sup>,  
Solimar A. de Oliveira<sup>1</sup> e Silvana B. Rascoli<sup>1</sup>.

*Analisaram-se 300 amostras fecais de crianças na faixa etária de até 8 anos, na cidade de Goiânia, objetivando-se determinar o percentual de rotavírus e adenovírus em processos diarreicos, frente a outros microorganismos patogênicos entéricos (bactérias ou parasitos). Rotavírus foram detectados isoladamente em 47 casos e, associando-se a outros agentes, em 21 casos. Adenovírus foram encontrados em 7 casos, sendo que em 6 ocorreram isoladamente e em 1, associaram-se a outro microorganismo. Utilizaram-se três metodologias para a análise virológica: o ensaio imunoenzimático adaptado para rotavírus e adenovírus (EIARA), a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e a imunomicroscopia eletrônica (IME). O índice de concordância entre as três metodologias foi de 92,8%, entre EGPA e EIARA de 95,8% e entre a IME e EIARA de 100,0%. Dentre as amostras de rotavírus, 97,0% mostraram perfil eletroforético longo, compatível com o subgrupo II.*

Palavras-chaves: Adenovírus. Rotavírus. Gastreenterite.

As gastroenterites virais são causas importantes de morbidade e mortalidade infantil. Os rotavírus são responsáveis pela maior parte das diarreias agudas não bacterianas<sup>7 19</sup>, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Quando ocorrem nos primeiros anos de vida geralmente produzem diarreia severa, requerendo hospitalização<sup>32 35</sup> e, apesar de sua importância para as crianças de baixa idade, podem ainda ser associados a doença em grupos etários mais elevados incluindo adultos<sup>24</sup>.

Os adenovírus entéricos, considerados distintos dos sorotipos previamente estabelecidos<sup>6 11 18 20</sup>, têm emergido como agentes importantes nas diarreias infantis<sup>3 11 30 34</sup>, e ainda, em períodos de surtos principalmente, podem afetar pessoas de maior idade<sup>31</sup>, havendo também evidência de transmissão nosocomial<sup>25</sup>.

Outros grupos de vírus, tais como calicivírus, astrovírus, coronavírus e o agente de Norwalk<sup>5</sup>, têm sido também associados a quadro clínico de gastroenterite.

A Organização Mundial da Saúde adota um programa de estudo destes agentes virais, e particularmente sobre os rotavírus. Este estudo deve abranger, dentre outros, aspectos epidemiológicos, como a maior distribuição viral por faixa etária e sazonalidade, bem como os fatores de risco associados à infecção simultânea dos rotavírus a outros patógenos, principalmente em países em desenvolvimento<sup>35</sup>.

Vários estudos têm sido feitos considerando os aspectos acima citados tanto no Brasil<sup>1 21 22 23</sup>, quanto em outros países<sup>7 35</sup>. Dentro destas perspectivas e dando continuidade à investigação anterior<sup>17</sup>, estudamos a circulação dos rotavírus e adenovírus em espécimes fecais de 300 crianças hospitalizadas que tinham como causa da internação gastroenterite aguda.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Espécimes clínicos*

Num período de 15 meses, compreendido entre março de 1986 a maio de 1987, foram coletadas e analisadas 300 amostras fecais de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda, numa faixa etária de até 8 anos. Elas foram atendidas principalmente em duas unidades de reidratação oral do Instituto Nacional de Assistência Médica e Previdência Social (INAMPS) e em uma da Organização de Saúde do Estado de Goiás (OSEGO), além de duas clínicas infantis particulares da cidade de Goiânia - GO.

Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO<sup>1</sup> e Departamento de Biologia Celular - Fundação Universidade de Brasília - Brasília, DF.

Suporte Financeiro da FINEP.

Endereço para correspondência: Profa. Divina das Dores P. Cardoso. Depto. de Microbiologia/IPTSP/UFG. Pça. Universitária s/n. 74000 Goiânia, GO.

### Exames laboratoriais

Análise virológica - As 300 amostras fecais foram examinadas pelo ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus (EIARA), 132 das quais foram também estudadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para análise do ARN dos rotavírus e, ainda, 37 destas amostras foram examinadas pela imunomicroscopia eletrônica (IME).

A análise das amostras pelo EIARA foi feita utilizando um kit preparado e cedido pelo Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz e microplacas de polivinil (Hemobag - Produtos cirúrgicos), numa combinação de análise para rotavírus e adenovírus descrita por Pereira e cols, 1985<sup>27</sup>. O estudo realizado através da EGPA foi feito segundo metodologia descrita por Pereira e cols, 1983<sup>29</sup>. A IME foi feita segundo Barth<sup>2</sup>.

Análise parasitológica - Realizada segundo Hoffman e cols<sup>14</sup> e Faust e cols<sup>10</sup>.

Análise bacteriológica - Feita de acordo com a técnica descrita por Edwards e Ewing<sup>8</sup> e por Evans e Evans<sup>9</sup>.

Na análise estatística foi empregado o teste  $\chi^2$ .

### RESULTADOS

Trezentas amostras fecais de crianças menores de 8 anos e com sintomas de gastroenterite aguda foram analisadas para a pesquisa de microrganismos patogênicos: vírus (adenovírus e rotavírus) bactérias e parasitos. Deste total, observamos a presença de bactérias em 89 casos (29,7%), vírus em 75 casos (25,0%) e parasitos em 31 casos (10,3%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Microrganismos patogênicos encontrados, isoladamente ou associados, em amostras de fezes de crianças com diarreia.

| Patógenos              | Nº Amostras | %            |
|------------------------|-------------|--------------|
| Rotavírus              | 47          | 15,6         |
| Rotavírus + bactéria*  | 14          | 4,6          |
| Rotavírus + parasito** | 07          | 2,3          |
| Adenovírus             | 06          | 2,0          |
| Adenovírus + bactéria  | 01          | 0,3          |
| Bactéria               | 69          | 23,0         |
| Bactéria + parasito    | 05          | 1,6          |
| Parasito               | 19          | 6,3          |
| Amostras negativas     | 132         | 44,0         |
| <b>Total</b>           | <b>300</b>  | <b>100,0</b> |

\* Bactérias patogênicas isoladas/nº de isolamentos: *Shigella flexneri*/6, *Shigella dysenteriae*/4, *Shigella sonnei*/5, *Shigella boydii*/5, *E. coli* enteropatogênica clássica/59 e *E. coli* invasora/8.

\*\* Parasitos patogênicos isolados/nº de isolamentos: Protozoários: *Giardia lamblia*/16  
Helmintos: *Hymenolepis nana*/7, *Ancilostomídeos*/1  
*Ascaris lumbricoides*/10 e *Trichocephalus trichiurus*/01

Não foram feitos procedimentos para análise de *E. coli* toxigênica LT e ST, nem para pesquisa de *Cryptosporidium* sp.

Os rotavírus foram encontrados isoladamente em 15,6% dos casos e associados a outros patógenos em mais 6,9% de casos. Os adenovírus estiveram presentes isoladamente em 2,0% dos casos e em associação em mais 0,3% de casos. As bactérias patogênicas ocorreram isoladamente em 23,0% dos casos e associadas a outros patógenos (parasitos), em outros 1,6% de casos. Os parasitos patogênicos apareceram isoladamente em 6,3% dos casos.

A Tabela 2 mostra a circulação dos rotavírus considerando os meses do ano. Observamos que no ano de 1986 houve predominância destes vírus (P < 0,05) no mês de julho. Quanto ao perfil eletroforético verificamos que 97,0% dos rotavírus mostraram um perfil característico do subgrupo II e 3,0% do subgrupo I.

Tabela 2 - Relação mensal da ocorrência de rotavírus em amostras fecais de crianças com diarreia.

| Mês/ano | Nº Amostras examinadas | % de positividade |
|---------|------------------------|-------------------|
| 03/86   | 18                     | 11,1 (02)         |
| 04/86   | 17                     | 35,3 (06)         |
| 05/86   | 05                     | 20,0 (01)         |
| 06/86   | 28                     | 35,7 (10)         |
| 07/86   | 10                     | 50,0 (05)         |
| 08/86   | 06                     | 33,3 (02)         |
| 09/86   | 10                     | 00,0 (00)         |
| 10/86   | 15                     | 20,0 (03)         |
| 11/86   | 36                     | 2,7 (01)          |
| 12/86   | 21                     | 19,0 (04)         |
| 01/87   | 12                     | 16,6 (02)         |
| 02/87   | 20                     | 25,0 (05)         |
| 03/87   | 40                     | 20,0 (08)         |
| 04/87   | 47                     | 31,9 (15)         |
| 05/87   | 15                     | 26,6 (04)         |

O índice de concordância entre as três metodologias empregadas na análise viral é mostrado na Tabela 3, onde todos concordam em 92,8%, EIARA e IME em 100,0% e EIARA e EGPA em 95,8%.

Tabela 3 - Percentual de concordância entre diferentes metodologias utilizadas na análise de uma mesma amostra fecal para rotavírus e adenovírus.

| Técnicas           | Amostras     |                  |
|--------------------|--------------|------------------|
|                    | Concordantes | Não Concordantes |
| IME - EIARA - EGPA | 26 (92,8%)   | 02 (7,2%)        |
| EIARA - IME        | 09 (100,0%)  | -                |
| EIARA - EGPA       | 92 (95,8%)   | 04 (4,2%)        |

IME: imuno microscopia eletrônica

EIARA: ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus.

EGPA: eletroforese em gel de poliacrilamida.

A análise considerando o aparecimento de rotavírus e adenovírus, por faixa etária e sexo, não mostrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para nenhum dos dois vírus.

## DISCUSSÃO

A presença de rotavírus na gastroenterite tem sido enfatizada na literatura<sup>1 7 13 23</sup> mostrando o papel significativo destes agentes neste processo. Em nosso estudo observamos que eles ocorreram em 22,5% dos casos da doença e em 15,6% deles, estes foram os únicos patógenos encontrados, o que leva a admitir que possam ser a causa da síndrome. Em outros 6,9% dos casos os rotavírus apareceram em concomitância a outros microorganismos considerados patogênicos para o trato gastrointestinal e nesta situação não podemos concluir a respeito do agente causal primário da infecção.

Os adenovírus estiveram presentes em 2,3% dos casos diarreicos. Estes agentes foram detectados tanto pela IME quanto pelo EIARA. Mas, como não foram feitos procedimentos específicos para determinação de adenovírus entéricos<sup>6 12 18</sup> há dificuldade em concluir sobre a natureza destes e mesmo sobre o seu papel na doença, não obstante a literatura venha assinalando a responsabilidade destes vírus em tais processos<sup>3 6 30 33</sup>.

Quanto à sazonalidade, os rotavírus, apesar de endêmicos, mostraram um pico maior nos meses mais frios de nossa região os quais são geralmente coincidentes com uma baixa umidade do ar atmosférico. Nesse particular houve diferença estatística significativa e essa pode ser atribuída ao número reduzido destes vírus nos meses de setembro a novembro. Na literatura existem dados indicando que a sazonalidade dos rotavírus é bastante diversificada podendo ser delimitada em algumas regiões<sup>1 3</sup> bem como inexistente em outras<sup>23</sup>.

A análise dos rotavírus pela EGPA mostra que 97,0% das amostras exibiam perfil eletroforético típico do subgrupo II ("longo"). Vários estudos mostram que, pelo menos no Brasil<sup>21 28 29</sup> este é o padrão prevalente e bastante disseminado tanto em relação a tempo quanto a espaço<sup>13 28</sup>, enquanto que as amostras com perfil eletroforético do subgrupo I ("curto"), provêm geralmente de uma fonte comum de infecção num intervalo de tempo delimitado<sup>29</sup>.

Uma amostra de rotavírus mostrou na EGPA mais de 11 segmentos de ARN. A EGPA permite distinção de vários eletroforótipos de rotavírus<sup>7</sup>, o que é útil e importante epidemiologicamente, além de poder detectar a ocorrência de infecções mistas<sup>28</sup> em

que numa única ocasião duas cepas diferentes podem infectar uma mesma pessoa. Admite-se também que segmentos extras de ARN possam ser devidos à presença de vírus oriundos de recombinação genética<sup>4</sup>, ou à de vírus produzido por processo mutacional, resultando em variações no tamanho dos segmentos de ARN durante a infecção<sup>15</sup> ou, ainda, pelo aparecimento de partículas interferentes não defectivas<sup>16 26</sup>.

O índice de concordância entre as três metodologias empregadas foi bastante significativo, o que leva a considerar que tanto a EGPA quanto o EIARA são bastante sensíveis quando comparados à IME considerado o método padrão.

## SUMMARY

*In an attempt to detect rotavirus and adenovirus prevalence among other enteropathogens (bacteria and parasites) in diarrhoea, three hundred fecal samples originating from children living in Goiânia city (Goiás state, Brazil) were analysed. Rotavirus was found to be the only pathogen in 47 cases, and associated with other infectious agents in 21 cases. 97,0% positive samples of rotavirus showed an electrophoretic pattern characteristic of subgroup II. Adenovirus was found in 7 cases, and associated with other microorganisms in 1 case. Three methods were applied for virological analyses: enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoelectron microscopy (IEM). The concordance among the three methods was 92.8%, PAGE and EIARA agreed in 95.8%, and IEM and EIARA agreed in 100.0%.*

*Key-words: Adenovirus. Rotavirus. Gastroenteritis.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azeredo RS, Leite JPG, Pereira HG, Vidal MNP, Andrade ZP, Farias V, Suttmoller F, Schatzmayr HG. Agentes virais associados à gastroenterite infantil no Rio de Janeiro - 1º semestre 1983. Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde XV: 193-194, 1983.
2. Barth, OM. Estudo sobre a contrastação negativa de suspensões virais. Revista Brasileira de Biologia 44:71-80, 1984.
3. Chiba S, Nakata S, Nakamura I, Tamiguchi K, Urasawa S, Fujinaga K, Nakao T. Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. Lancet II: 954-957, 1983.

4. Clarke IN, McCrae MA. Structural analysis of electrophoretic variation in the genome profiles of rotavirus field isolates. *Infection and Immunity* 36:492-497, 1982.
5. Cukor G, Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews* 48:157-179, 1984.
6. De Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadell G, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Wermenbol AG, Firtzlaff RG. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *Journal of Medical Virology* 11:215-231, 1983.
7. Dimitrov DH, Graham DY, Lopez J, Muchnik G, Velasco G, Stenback WA, Estes MK. RNA electropherotypes of human rotaviruses from North and South America. *Bulletin of the World Health Organization* 62:321-329, 1984.
8. Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae (3<sup>rd</sup> edit) Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972.
9. Evans Jr DJ, Evans DG. Direct serological assay for the heat labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infection and Immunity* 16:604-609, 1977.
10. Faust EC, D'Antoni JS, Odan V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JM. Critical study of clinical laboratory techniques for diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. *American Journal of Tropical Medicine* 18:169-183, 1938.
11. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Epidemic viral enterites in a long-stay children's ward. *Lancet* I:4-5, 1975.
12. Gary Jr GW, Hierholzer JC, Black RE. Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: a new subgroup of human adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 10:96-103, 1979.
13. Gómez JA, Biscotti EI, Bercovich JA, Grinstein S. Epidemiology of human rotaviruses in Argentina as determined by RNA genome electrophoresis. *Intervirology* 26:174-180, 1986.
14. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation-concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 9:283-291, 1934.
15. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Graban E, Nichol S, Vandepol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577-1585, 1982.
16. Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desseeberger V. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 143:88-103, 1985.
17. Ishak R, Linhares AC, Gabbay Y, Ishak MDG, Cardoso DDP. Soroepidemiologia de rotavírus em uma população infantil, Goiânia, Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 26:280-284, 1984.
18. Johansson ME, Uhnnoo I, Kidd AH, Madeley CR, Wadell G. Direct identification of enteric adenovirus a candidate new serotype associated with infantile gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 12:95-100, 1980.
19. Kapikian AZ, Cline WL, Kim HW, Kalika AR, Wyatt RG, Kirkvan DH, Chanock RM, James Jr HD, Vaughn AL. Antigenic relationships among five reovirus like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 152:535-539, 1976.
20. Leite JP, Pereira HG, Azeredo RS, Schatzmayr HG. Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* 15:203-209, 1985.
21. Linhares AC, Ferreira FS, Mavues BC, Benchimol JA, Gabbay YB. Prevalência de anticorpos para rotavírus em crianças diarreicas de Belém, Brasil. *Revista da Fundação SESP* 28:95-105, 1983.
22. Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Silva IX, Vieira JJA, Ferreira SF, Figueiras ACM, Loureiro MGS. Estudo longitudinal das infecções por rotavírus em crianças de Belém, Brasil: Primeiros dezoito meses. *Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde* XVII: 49-59, 1985.
23. Linhares AC, Monção HC, Gabbay YB, Araujo VLC, Serruya AC, Loureiro ECB. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:384-390, 1983.
24. Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune isolated South American Indian community. *American Journal of Epidemiology* 113:703-710, 1981.
25. Middleton RJ, Szymanski HI, Petric M. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *American Journal of Diseases of Children* 131:733-737, 1987.
26. Pedley S, Bridger JC, Brown JF, McCrae MA. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *Journal of General Virology* 64:2093-2101, 1983.
27. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *Journal of Virological Methods* 10:21-28, 1985.
28. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Sutmoller F, Farias V, Vidal MNP. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnoses of rotavirus infection in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 78:483-490, 1983.
29. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Candeias JA, Rácz ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi JR. Elec-

- trophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *Journal of Hygiene* 90:117-125, 1983.
30. Retter M, Middleton PJ, Tam JS, Petric M. Enteric adenoviruses: detection, replication, and significance. *Journal of Clinical Microbiology* 10:574-578, 1979.
  31. Richmond SJ, Caul EO, Dunn SM, Ashley CR, Clarke SKR. An outbreak of gastroenteritis in young children caused by adenoviruses. *The Lancet* I:1178-1181, 1979.
  32. Schnags RD, Rodger SM, Holmes IH. Variation in human rotavirus electropherotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemics in Central Australia. *Infection and Immunity* 33:17-21, 1981.
  33. Uhnöo I, Wadell G., Svensson L, Johansson M. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. *Developments in Biological Standardization* 53:311-318, 1983.
  34. Whitelaw A, Davies H, Parry J. Electron microscopy of fatal adenovirus gastroenteritis. *The Lancet* I:361, 1977.
  35. World Health Organization, scientific activities. *Bulletin of the World Health Organization* 63:233-235, 1985.