

DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE PERFIS ELETROFORÉTICOS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ROTAVÍRUS EM FEZES DE CRIANÇAS EM BELÉM, PARÁ

JOANA D'ARC P. MASCARENHAS, YVONE B. GABBAY, RONALDO B. FREITAS & ALEXANDRE C. LINHARES

Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviços de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Caixa Postal 1128, 66050 Belém, PA, Brasil

Temporal distribution of rotavirus RNA electrophoretic profiles in Belém, Pará – *Electrophoresis of rotavirus RNA in polyacrylamide gel was carried out by using faecal samples collected from children living in the peripheral area of Belém, Brazil. Typical rotavirus profiles (eleven bands) were noted in 46 (76.7%) out of 60 ELISA rotavirus positive specimens. According to the electrophoretic patterns, 5 (10.9%) were classified as subgroup I, while 41 (89.1%) of them as subgroup II. Lacking of bands 10 and 11 in 14 (23.3%) samples did not allow us to classify their electrophoretotypes. The profile coded as "1N2L" was the predominant one, accounting for 65.2% of the classified strains.*

Key words: rotavirus – electrophoretic profiles – Belém

Os rotavírus representam, com efeito, um relevante problema de saúde pública como causa de gastroenterite infantil, contribuindo notavelmente para a mortalidade entre crianças de baixa idade em todo o mundo (Chengquin et al., 1986; Linhares et al., 1981; Suzuki et al., 1986).

São vírus de ampla dispersão, que infectam, além do homem, diversos mamíferos (Flewett & Woode, 1978). Constituem um gênero distinto dentro da família Reoviridae e associa-se sua diversidade antigênica a mudanças cumulativas provocadas por desvio, transposição e intercâmbio dos segmentos de ARN (Pedley et al., 1983, 1986; Rodriguez et al., 1983).

As especificidades antigênicas têm sido detectadas por meio de técnicas como ensaio imunoenzimático (ELISA) (Beards et al., 1984), e a classificação das cepas humanas em subgrupos foi feita entre outros procedimentos, mediante eletroforese do ARN virótico em gel de poliacrilamida (PAGE).

Estudos realizados no Rio de Janeiro, São Paulo e Pará (Pereira et al., 1983) através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida,

exibiram a distribuição geográfica dos dois subgrupos de rotavírus nesses três estados, mostrando a predominância do subgrupo II.

No presente relato nós estudamos a tipificação eletroforética das cepas prevalentes em uma comunidade, em espécimes fecais de 76 crianças habitantes na periferia de Belém.

MATERIAL E MÉTODO

Pacientes e espécimes – Espécimes fecais foram coletados no decorrer de três anos, provenientes de um estudo longitudinal das infecções causada por rotavírus entre crianças habitantes da periferia de Belém.

Foram selecionadas 88 crianças, das quais apenas 70 chegaram ao final do referido programa. Das mesmas foram coletadas, entre outros espécimes, fezes durante o período que a criança permaneceu no hospital, durante duas semanas em dias alternados, e, a partir daí, foram feitas visitas quinzenais. Quando a criança era acometida de síndrome diarréica colhia-se sistematicamente amostras de fezes.

Após a chegada das amostras ao laboratório, foram preparadas suspensões a 10% em tampão de fosfato (PBS) e estocadas a -20°C até a realização do teste.

Técnicas – ELISA: todas as amostras de fezes foram testadas por ELISA quando à detecção de antígeno de rotavírus usando-se kit cedi-

Trabalho desenvolvido no âmbito de convênio estabelecido entre a Organização Mundial de Saúde e a Fundação Serviços de Saúde Pública, do Ministério da Saúde.

Recebido em 11 de abril de 1988.

Aceito em 14 de setembro de 1988.

do pelo Regional Virus Laboratory, East Birmingham Hospital, Birmingham, Inglaterra (Beards et al., 1984). PAGE: a eletroforese foi processada somente nas amostras que exibiram antígeno de rotavírus nas fezes, conforme técnica descrita por Laemmli, (1970). O vírus foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e desproteinizado com fenol. Foram dispostas na placa de eletroforese, acrilamida 10% (w/v) e bisacrilamida 5% (w/v). A eletroforese foi conduzida a 35 mA por 6-8 h à temperatura ambiente e o gel foi corado através da impregnação pelo nitrato de prata.

O rotavírus Símio "SAll" foi incluído na corrida eletroforética como controle, bem como amostras previamente conhecidas pertencentes aos subgrupos I e II. Observou-se classificação proposta por Moosai et al. (1984).

RESULTADOS

A técnica de eletroforese mostrou ser bem sensível, observando-se o ARN em expressiva proporção: das 60 amostras positivas por ELISA, detectaram-se ARN em 46(76,7%) dos espécimes.

A Tabela registra apenas os casos de reinfecção, mostrando as diversidades genômicas encontradas entre os perfis eletroforéticos. Em dois pacientes o padrão "1N2L" foi detectado em infecções subseqüentes, seis amostras não exibiram qualquer perfil e, no restante, os perfis eletroforéticos não foram homólogos.

A distribuição temporal dos padrões eletroforéticos curto e longo em relação a casos sintomáticos e assintomáticos, no decorrer dos três anos, é observada na Fig. 1. O subgrupo II foi mais freqüente, ocorrendo ao longo de todo o estudo, enquanto o subgrupo I, ocorreu principalmente no último ano.

A Fig. 2 mostra o esquema da mobilidade eletroforética do genoma dos 46 rotavírus encontrados, evidenciando os "clusters" I, II, III e IV. Foram detectados no "cluster" I, dois perfis diferentes, no "cluster" II, dois perfis distintos, no "cluster" III, quatro padrões diferentes e no IV, três perfis diferentes.

Na Fig. 3 observamos a variação ao nível dos 11 segmentos de ARN dos rotavírus. Na coluna 1, observamos o rotavírus símio, nas colunas 2, 4, 5, 9 e 11 amostras relativas ao subgrupo II e nas colunas 3 e 6, rotavírus subgrupo I.

TABELA

Comparação entre os perfis eletroforéticos obtidos nos casos de reinfecções por rotavírus

Registro	Infecções	Perfis eletroforéticos
23.983	1ª	1N2L
	2ª	1N2L
	3ª	1W3 _u S
24.004	1ª	1N2L
	2ª	1W3 _u S
24.053	1ª	1N2L
	2ª	Neg
	3ª	Neg
24.059	1ª	1N2L
	2ª	Neg
	3ª	1N2L
24.080	1ª	1N2L
	2ª	1N2L
24.097	1ª	Neg
	2ª	2cW1L
24.108	1ª	1N2L
	2ª	2cN1L
24.145	1ª	Neg
	2ª	1N2L
24.191	1ª	Neg
	2ª	1N2L
24.378	1ª	1N2L
	2ª	2cN1L+
24.384	1ª	2cN2L
	2ª	Neg

DISCUSSÃO

A variedade dos perfis eletroforéticos de rotavírus tem sido analisada por muitos autores (Chanock et al., 1983; Houly et al., 1986; Pereira et al., 1983; Spencer et al., 1983) sugerindo as várias apresentações genômicas que esses vírus assumem.

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Spencer et al. (1983) no que concerne as variações que os 11 segmentos de ARN sofrem na sua mobilidade eletroforética.

Comparando-se a mobilidade eletroforética dos 11 segmentos do rotavírus envolvendo os subgrupos longo e curto observamos que: nos segmentos 1-4, no perfil longo as migrações ele-

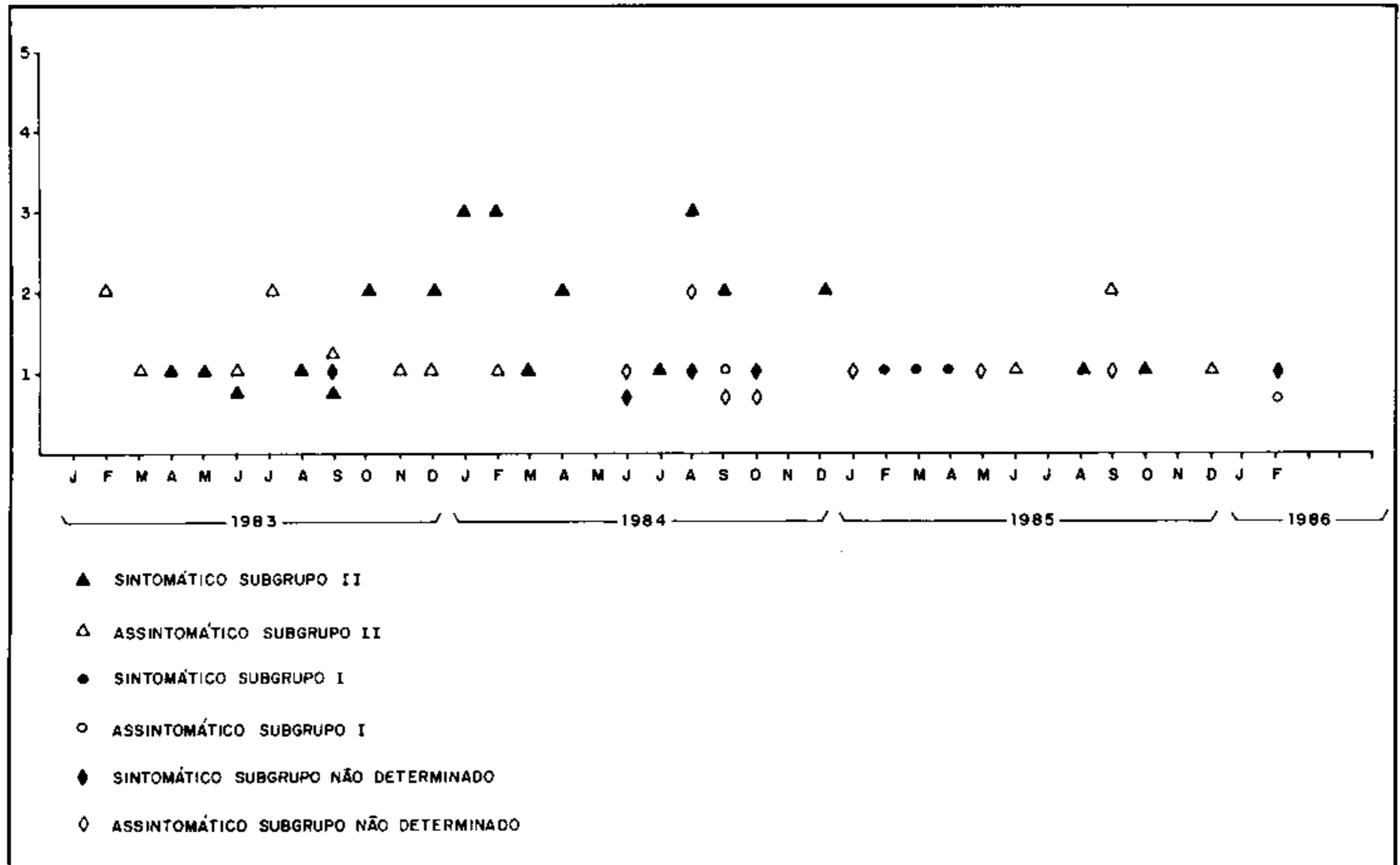


Fig. 1: distribuição temporal das infecções por rotavírus, janeiro de 1983 a fevereiro de 1986, Belém-Pará.

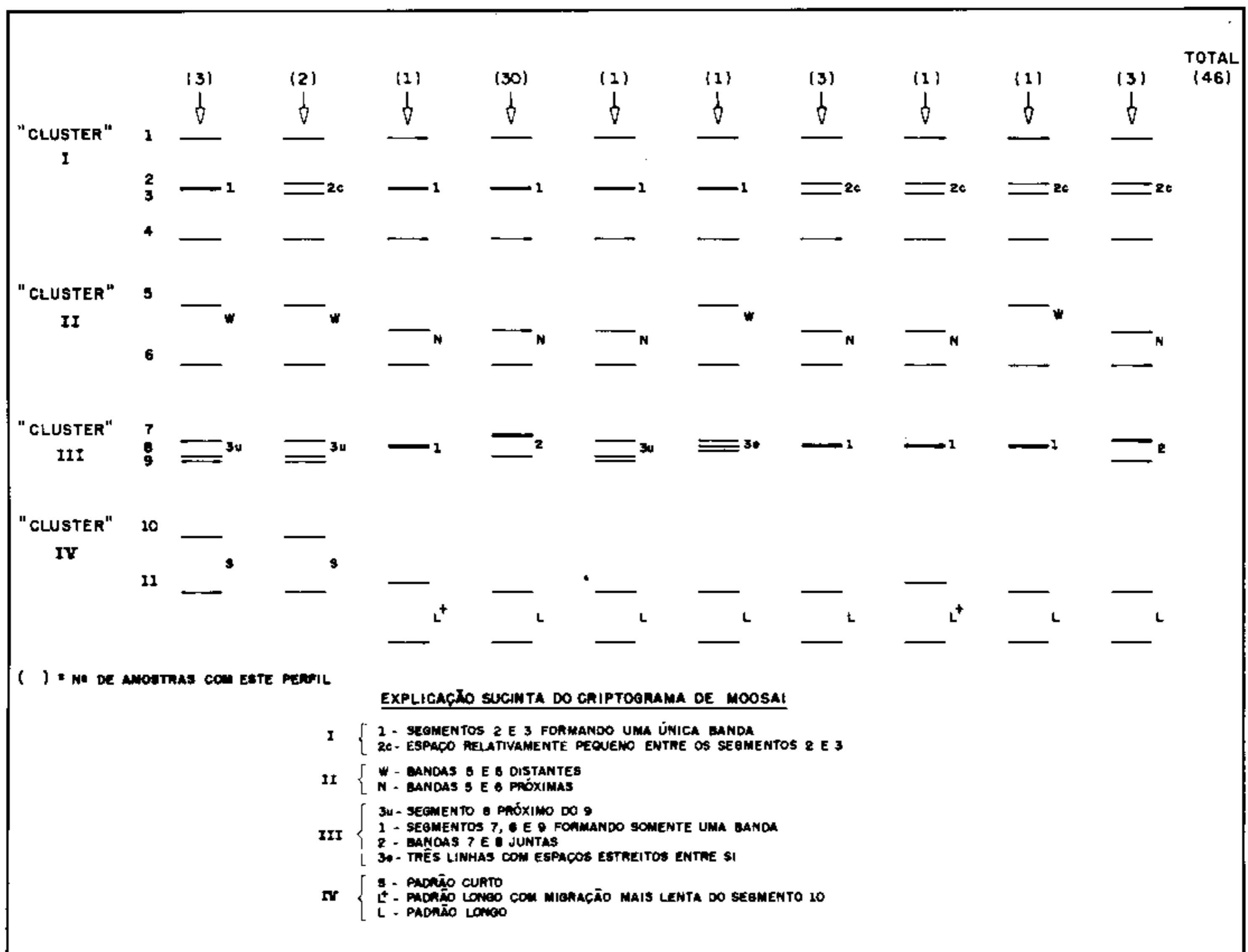
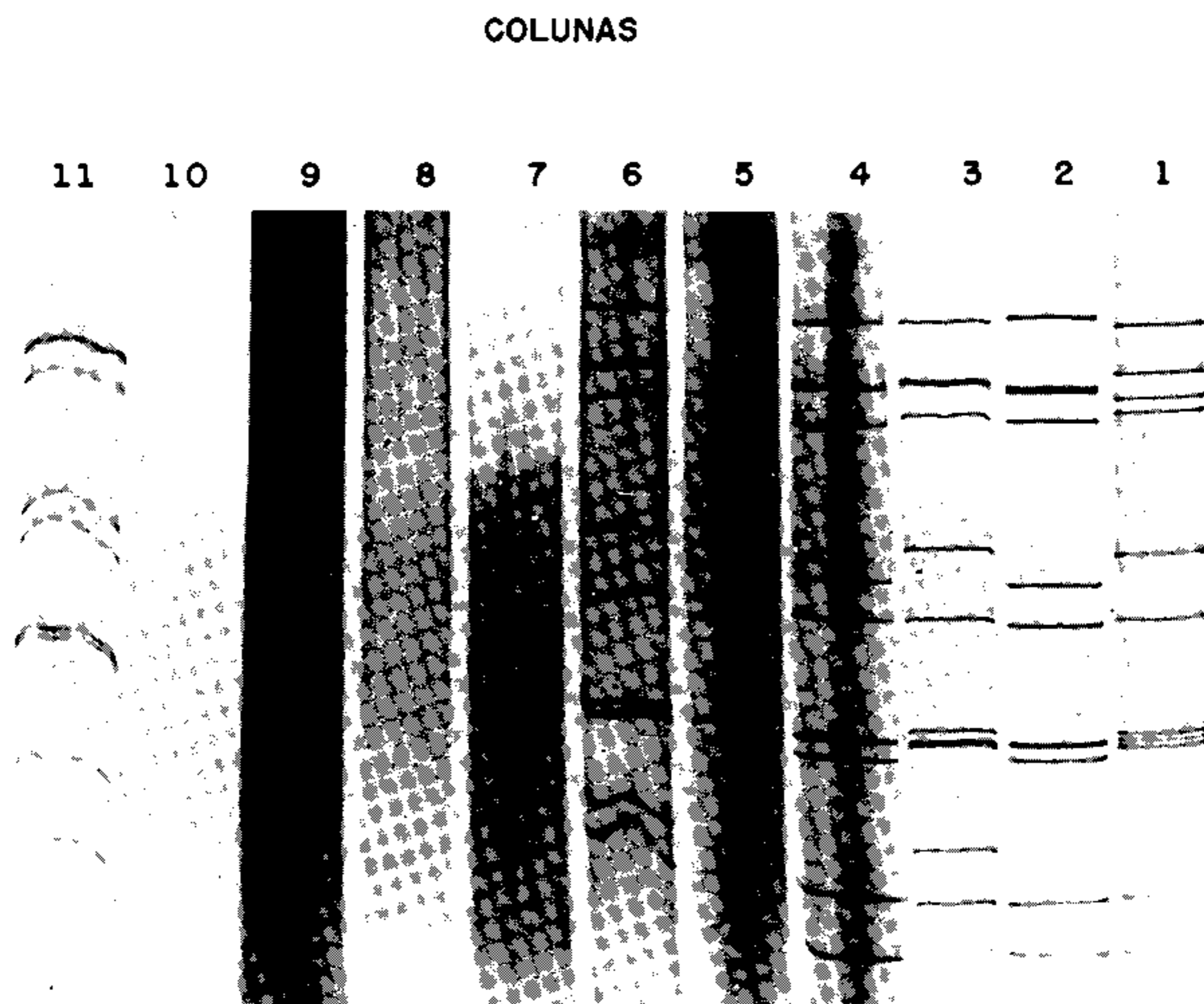


Fig. 2: representação esquemática dos 10 diferentes perfis eletroforéticos de ARN detectados em 46 amostras.



1 = SA 11

2, 4, 5, 9, 11 = SUBGRUPO II

3, 6 = SUBGRUPO I

Fig. 3: perfis eletroforéticos de amostras de rotavírus; observando-se as variações nos 11 segmentos de ARN.

troforéticas dos segmentos 2 e 3 foram distintas, com observação de 2 padrões de ARN. No primeiro padrão, as bandas 2 e 3 migraram juntas, já no segundo houve uma discreta separação entre esses segmentos. Vale ressaltar, que essa variação na migração eletroforética desses segmentos também foram observadas no perfil curto.

Com relação aos segmentos 5 e 6, observamos variação ao nível do segmento 5 e uma similaridade no segmento 6, ao compararmos os dois subgrupos. Esses resultados conferem com os de Spencer et al. (1983) que sugerem que as mobilidades eletroforéticas dos segmentos 5 e 6 podem definir os perfis longo e curto.

Analisando os fragmentos 7, 8 e 9, observamos variações apenas no perfil longo.

A mobilidade eletroforética do segmento 10 do perfil longo pareceu ser idêntica ao segmento 11 do perfil curto.

Rodriguez et al. (1983) em um estudo conduzido em hospital detectaram 10 perfis eletroforéticos diferentes em dois surtos. Spencer et al. (1983) encontraram 32 perfis eletroforéticos diferentes em 142 casos. Em nosso estudo, dos 46 casos classificados, apenas 10 perfis eletroforéticos diferentes foram encontrados.

Quanto à distribuição sazonal, os padrões eletroforéticos relativos ao perfil longo e codificado como "1N2L" foram os mais frequentes durante os três anos de estudo, ocorrendo em 30 (65,2%) dos 46 classificados.

As amostras referentes ao perfil curto ocorreram em determinados períodos. Fato seme-

lhante é reportado por Pereira et al. (1983) sugerindo o aparecimento de um surto.

Rodrigues et al. (1983) encontraram bandas extras em três casos, envolvendo dois surtos ocorridos em hospital. Em nosso estudo não se observou qualquer caso de bandas extras nos perfis eletroforéticos, excluindo-se, portanto, a possibilidade de infecções mistas.

O polimorfismo genômico encontrado nesses rotavírus não reflete, necessariamente, diversidade antigênica, particularmente no tocante aos possíveis sorotipos envolvidos (Beards, 1982). A determinação desses últimos, através de procedimentos específicos se impõe como um estudo complementar ao presente, com vistas a melhor avaliar futura estratégia de vacinação em nossa área.

RESUMO

Distribuição temporal de perfis eletroforéticos de ácido nucléico de rotavírus em fezes de crianças em Belém, Pará — Amostras de rotavírus provenientes de crianças habitantes na periferia de Belém, Pará, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As bandas correspondentes aos 11 segmentos de ARN foram detectadas em 46 (76,7%) das 60 amostras de rotavírus. Das amostras classificadas 5 (10,9%) foram relativas ao subgrupo I, 41 (89,1%) ao subgrupo II e, em 14 (23,3%) não foi possível classificação face à ausência das bandas 10 e 11. As amostras de rotavírus subgrupo II e codificadas como "1N2L" foram as mais frequentes, ocorrendo em 30 (65,2%) das 46 classificadas.

Palavras-chave: rotavírus — perfis eletroforéticos — Belém

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Srs. Antonio de Moura, Luiz Baía e Airton Teixeira pelo apoio técnico; e as Sras. Gládis Diniz Marins e Conceição Chagas pelos serviços datilográficos que nos proporcionaram.

REFERÊNCIAS

- BEARDS, G. M., 1982. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch. Virol.*, 74: 65-70.

- BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A. D.; COTTRELL, N. R.; PEIRIS, J. S. M.; REES, N.; SANDERS, R. C.; SHIRLEY, J. A.; WOOD, H. C. & FLEWETT, T. H., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 248-254.
- CHANOCK, S. J.; WENSKE, E. A. & FIELDS, B. N., 1983. Human rotaviruses and genome RNA. *J. Infect. Dis.*, 148: 49-50.
- CHENGQIN, S.; YILUN, W.; HONGKAI, S.; DAI-BAO, W.; YUNHUA, C.; DOGMIN, W.; LINA, H. & ZAOLUN, Y., 1986. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J. Med. Virol.*, 19: 167-173.
- FLEWETT, T. H. & WOODE, G. N., 1978. The rotaviruses. *Arch. Virol.*, 57: 1-23.
- HOULY, A. 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., 1986. Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Maceió, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 19: 33-37.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A. & BEARDS, G. M., 1981. An outbreak of rotavirus diarrhoea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am. J. Epidemiol.*, 113: 703-710.
- MOOSAI, R. B.; ALCOCK, R. & MADELEY, C. R., 1984. A cryptogram for recording rotavirus strains: the Rotacode. *J. Hyg. Camb.*, 93: 237-250.
- PEDLEY, S.; BRIDGER, J. C.; BROWN, J. F. & McCRAE, M. A., 1983. Molecular characterization of rotavirus with distinct group antigens. *J. Gen. Virol.*, 64: 2093-2101.
- PEDLEY, S.; BRODGER, J. C.; CHASEY, D. & McCRAE, M. A., 1986. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J. Gen. Virol.*, 67: 131-137.
- PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RÁCZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. & TRABULSI, J. R., 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg. Camb.*, 90: 117-125.
- RODRIGUEZ, W. J.; KIM, H. W.; BRANDT, C. D.; GARDNER, M. K. & PARROTT, H., 1983. Use of electrophoresis of RNA from human rotavirus to establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. *J. Infect. Dis.*, 148: 34-40.
- SPENCER, E.; AVENDAÑO, F. & ARAYA, M., 1983. Characteristics and analysis of electropherotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J. Infect. Dis.*, 148: 41-48.
- SUZUKI, H.; SATO, T.; KITAOKA, S.; TAZAWA, F.; KONNO, T.; AMANO, Y.; ALPRECHT, A. A.; VERA, E. G.; VILLALTA, J. L.; NUMAZAKI, Y. & ISHIDA, N., 1986. Epidemiology of rotavirus in Guayaquil, Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35: 372-375.