

Detecção do rotavírus humano em crianças hospitalizadas com quadros diarréicos em Salvador, Bahia, Brasil

Detection of human rotavirus in children with diarrhea episodes in Salvador, Bahia, Brazil

GÚBIO SOARES CAMPOS¹, SÍLVIA INÊS SARDE², ALINE SANTOS SAMPAIO³,
VIVIANE BRANDÃO BANDEIRA DE MELLO³

¹ Farmacêutico Bioquímico. Pesquisador. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

² Professora de Microbiologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

³ Bolsista PIBIC-CNPq. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

Resumo

A diarreia aguda infantil é um importante problema na saúde pública e os rotavírus são responsáveis por cerca de 20 a 40% dos casos de diarreia severa e desidratação em crianças de 0 a 5 anos de idade. Foram analisadas fezes de crianças de 0 a 4 anos que estiveram hospitalizadas com diarreia no período de outubro de 1998 a dezembro de 1999, em Salvador. As amostras foram analisadas por técnicas de ELISA e SDS-PAGE. Das 217 amostras testadas, 76 (35%) foram positivas para rotavírus, 127 (58,5%) foram negativas e 14 (6,5%) divergiram quanto ao resultado. Através da análise das amostras positivas por SDS-PAGE, pôde-se identificar os rotavírus pertencentes ao grupo A, classificando-os em eletroferotipos curtos, comuns ao subgrupo I, e longos, comuns ao subgrupo II.

Palavras-chave

Rotavírus humano, diagnóstico, eletroferotipos

Dr. Gúbio Soares Campos
Laboratório de Virologia
Departamento de Biointeração
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela
40.110-100 - Salvador, Bahia, Brasil
e-mail: labviro@svn.com.br

Introdução

Os rotavírus são os principais agentes virais causadores de diarreia aguda infantil. Eles são responsáveis por quase 125 mil casos de diarreia por ano, representando 20% a 40% das hospitalizações por diarreia em crianças menores de cinco anos (RAMACHANDRAN, 1998).

Os rotavírus são vírus pertencentes à família *Reoviridae*. A denominação rotavírus deve-se à sua semelhança com uma roda de carroça ao microscópio eletrônico (PARASHAR, 1998). Têm tamanho de 70 nm de diâmetro, o genoma viral é formado por onze segmentos de RNA de fita dupla responsáveis pela codificação de sete proteínas estruturais e seis outras não estruturais (FIELDS, 2001). São vírus não envelopados que possuem dupla cápside protéica icosaédrica, sendo a externa formada pelas proteínas VP7 e VP4 e a interna formada pela VP6. Esta última permite a classificação dos rotavírus em sete grupos designados de A a G, sendo os do grupo A responsáveis pela quase totalidade das infecções. A proteína VP7 é glicosilada e principal constituinte do capsídeo externo; ela induz a produção de anticorpos neutralizantes. A proteína VP4 está associada às diversas funções biológicas do vírus. Estas duas proteínas classificam os rotavírus em genótipos especificados em tipos G (VP7) e tipos P (VP4).

O rotavírus produz uma gastroenterite aguda transmitida através da via fecal-oral, pois o vírus se instala nos enterócitos maduros do intestino delgado. Há lesão direta da borda em escova, causando diarreia aguda secretória, com má absorção de nutrientes, perda de fluidos e eletrólitos, que muito freqüentemente leva à desidratação. Podem-se apresentar vômitos, febre, distensão abdominal e sintomas respiratórios associados (TEIXEIRA et al., 1998). Muitos estudos indicam que aproximadamente 70% das infecções sintomáticas por rotavírus ocorrem entre os 6 e os 24 meses de idade (VERONESI, 1996).

No Brasil, os primeiros achados ocorreram em Belém, Pará, em 1976 e, desde então, já foram diagnosticados rotavírus em todo o

território nacional, ressaltando a relevância que assumem esses agentes na gênese das diarreias agudas infantis (LINHARES et al., 1993; SANTOS; GOUVEA, 1997).

Os estudos feitos com pacientes hospitalizados detectaram que os tipos de rotavírus encontrados nesses pacientes refletem os mesmos que apresentam os indivíduos infectados na comunidade e que não recorreram à hospitalização (VERONESI, 1996).

Nosso trabalho teve o objetivo de iniciar um estudo epidemiológico para observar a frequência dos rotavírus como causadores de diarreia em crianças e caracterizar o padrão eletroforético do rotavírus encontrado.

Materiais e métodos

Coleta de amostras

A coleta de amostras foi realizada no período de outubro de 1998 a dezembro de 1999. Foram coletadas amostras de fezes de crianças de 0 a 4 anos (n = 217), com quadro clínico diarreico, hospitalizadas na Unidade Metabólica Fima Lifshitz do Centro Pediátrico Prof. Hosannah de Oliveira e no Hospital Martagão Gesteira, Salvador, Bahia.

As fezes foram congeladas a -20°C até seu processamento.

Teste imunoenzimático-ELISA

As fezes foram, primeiramente, submetidas ao teste de ELISA TestPack ABBOT, kit de uso comercial, segundo as instruções e a interpretação dos resultados do fabricante.

Extração de RNA

As fezes foram diluídas em solução salina buferada (PBS) 20% (v/v) e centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi tratado com 10% de uma solução de SDS, 10% e 5% de uma solução de EDTA 100 mM e aquecido a 56°C durante 20 minutos. A extração de RNA viral foi feita com uma solução de fenol-clorofórmio adicionada em volume igual ao sobrenadante

das fezes tratadas e posteriormente centrifugada a 12.000g durante 10 minutos, coletando-se a fração aquosa. A este sobrenadante foram adicionados 100 µl de acetato de Na 3M e 1 ml de etanol absoluto, sendo deixado por toda a noite a -20°C. Posteriormente, foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante, e o precipitado final foi ressuspenso em um *buffer* desnaturante (Tris/HCl, pH 6,8, 125 mM, SDS 4%, mercapto etanol 3%, glicerol 20%, azul de bromofenol 20%) para posterior análise por SDS-PAGE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O RNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 7.5% (SDS-PAGE) a 40 V, durante a noite, e posteriormente submetido a uma solução fixadora (etanol 10%-ácido acético 0,5%) e logo corado com uma solução de AgNO₃ 7 mM. Isto permitiu a visualização das bandas correspondentes aos segmentos de RNA viral.

Resultados e discussão

Das 217 amostras processadas pelos métodos ELISA e SDS-PAGE, 76 foram positivas para rotavírus (35%) e 127 (58,5%) foram negativas. Apenas 14 amostras (6,5%) mostraram resultados divergentes entre os dois métodos, 12 foram positivas apenas por ELISA e duas positivas por SDS-PAGE (TAB. 1 e FIG. 1).

TABELA 1
Detecção de rotavírus por ELISA e SDS-PAGE em amostras fecais

	Positivo	Negativo	Divergente	Total
Nº de amostras	76	127	14	217
Porcentagem (%)	35	58,5	6,5	100

Na FIG. 2, observa-se que houve uma concentração de resultados nos meses de agosto e setembro, coincidindo com o período de maior número de amostras analisadas. Em 5 amostras não foi possível identificar o mês em que ocorreu o episódio diarreico.

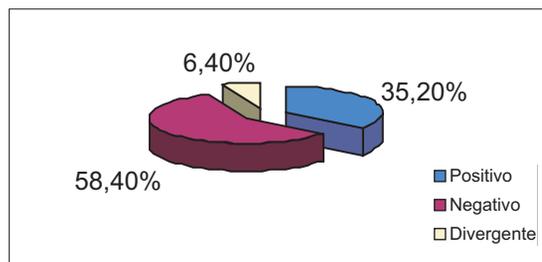


FIGURA 1 - Detecção de rotavírus em amostras de fezes diarreicas em Salvador, BA, no período de outubro de 1998 a dezembro de 1999

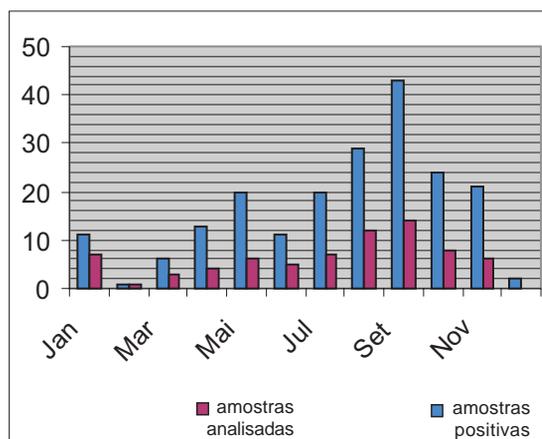


FIGURA 2 - Casos positivos de diarreia por rotavírus durante o período de um ano em Salvador, Bahia

Na FIG. 3, mostra-se o padrão eletroforético da cepa protótipo e de algumas das amostras positivas. O vírus padrão cepa SA11 do grupo A, encontra-se na 8ª linha. Observa-se que o padrão eletroforético consta de 11 bandas ou segmentos de RNA, agrupados em 4 blocos segundo a disposição de 4 bandas, 2 bandas, 3 bandas e 2 bandas, agrupamento que distingue o grupo A (GOUVEA; SANTOS, 1998). Ao analisar as amostras por SDS-PAGE, ficou demonstrado que 27 apresentaram perfil eletroforotípico curto e 51 apresentaram o perfil longo. Isso ocorre porque o 11º segmento de RNA migra mais lentamente do que o usual e fica localizado entre o 9º e o 10º segmentos, caracterizando um padrão curto, comum à maioria dos rotavírus do subgrupo I. Da mesma forma, o eletroferotipo longo é característico da maioria dos rotavírus do subgrupo II.

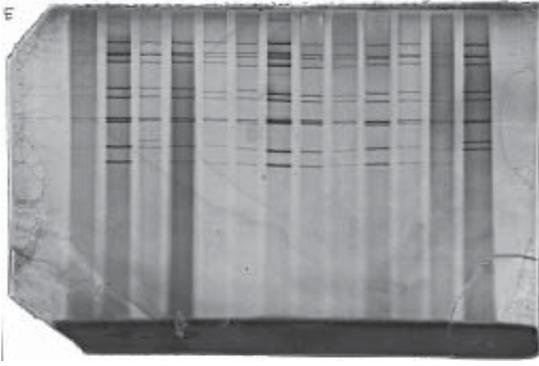


FIGURA 3 - Corrida em gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) do RNA viral. O vírus protótipo SA11 do grupo A de rotavírus pode ser visualizado na 8ª coluna. Nas 3ª e 13ª colunas, observam-se padrões eletroforéticos curtos e, nas demais colunas, padrões longos. Todas as amostras revelaram a presença de grupo A de rotavírus.

Neste trabalho, contou-se que a frequência de diarreia por infecção a rotavírus em crianças hospitalizadas na região de Salvador foi de 35%, achado semelhante ao encontrado na literatura (20% e 40%) para diferentes regiões do país (GOUVEA; SANTOS, 1998; SPECTER; HADINKA; YOUNG, 2000), assim como uma maior concentração de casos positivos nos meses de inverno, apesar de existirem casos positivos durante todo o ano.

O teste utilizado (ELISA) é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade para a detecção de rotavírus. O *kit* comercial utilizado neste trabalho demonstrou correspondência com os dados obtidos no SDS-PAGE. Das 217 amostras testadas, apenas 10 foram negativas por SDS-PAGE e positivas por ELISA. Isso pode ser explicado pelo fato de que a técnica por SDS-PAGE precisa de uma carga viral maior para a detecção do RNA viral ou de que a degradação do RNA pela ação enzimática das fezes dificulta sua detecção. Embora o ELISA seja uma técnica de alta sensibilidade, não fornece informação sobre

o tipo de rotavírus envolvido na infecção. Por isso o SDS-PAGE continua sendo uma ferramenta importante na epidemiologia molecular das rotaviroses. É uma técnica que oferece a vantagem de ser simples e de fácil implementação em laboratórios de rotina diagnóstica. Neste estudo, o SDS-PAGE permitiu a detecção de eletroferotipos longo e curto, demonstrando a presença de subgrupos I e II, respectivamente, com uma frequência que foi semelhante à encontrada na literatura (GOUVEA; SANTOS, 1998; SPECTER; HADINKA; YOUNG, 2000). Por outra parte, não foram detectadas infecções mistas, visto que todas as amostras avaliadas não exibiram mais de 11 segmentos de RNA viral.

Conclusões

Deste estudo, podemos concluir que o rotavírus é um agente etiológico de importância nas diarreias em crianças hospitalizadas na região de Salvador, demonstradas a sua frequência e a presença de eletroferotipos diferentes. Este achado deve ser tomado em consideração nos diagnósticos clínico-laboratoriais ante a apresentação de quadros clínicos de diarreias infantis.

Este estudo terá continuidade, visando a identificação nas amostras dos genótipos mais prevalentes na região. Estes dados serão um importante aporte na epidemiologia molecular das diarreias causadas por rotavírus, já que se prevê, no futuro, uma possível aplicação de vacinas contra essa infecção.

Agradecimentos

À FAPESB-SEPLANTEC, pelo apoio ao Laboratório de Virologia, ICS-UFBA. Ao CNPq, pela bolsa PIBIC. À Unidade Metabólica Fima Lifshitz do Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira e ao Hospital Marta-gão Gesteira.

Abstract

Acute infantile diarrhea is an important problem in public healthcare and Rotaviruses are responsible for about 20-40% of the cases of severe dehydrating diarrhea in children at 0-5 years old. In this work, we have analyzed diarrheic feces from children at 0-4 years old hospitalized between October 1998 and December 1999, in Salvador, Bahia, Brazil. In order to detect rotavirus, the samples were analyzed by ELISA (Test-Pack Abbot) and SDS-PAGE tests. The results demonstrated that from the 217 samples tested, 76 (35%) were positive, 127 (58,5%) were negative and 14 (6,5%) diverged in both tests. The positive samples analyzed by SDS-PAGE test revealed the group A rotavirus and they were classified as short eletrophenotypes (Subgroup I) and long eletrophenotypes (Subgroup II).

Key words

Rotavirus, diagnoses, eletrophenotypes

Referências

- FIELDS, B. **Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N. Detecção de rotavirus atípicos em crianças com diarreia no Rio de Janeiro. **NewsLab**, n. 32, p. 15-24, 1998.
- LINHARES, A. et al. Rotavirus serotypes and electrophenotypes among children attending three pediatric hospitals in Belém, Brazil. **J. Trop. Ped.**, n. 39, p. 137-141, 1993.
- PARASHAR, U. D. Rotavirus. **Emerging Infections Diseases**, v. 4, p. 561-567, 1998.
- RAMASHANDRAN, M. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3223-3229, 1998.
- SANTOS, N.; GOUVEA, V. Infecção por rotavirus: aspectos atuais. **Journal of Brazilian Pathology**, v. 33, n. 2, p. 94-102, 1997.
- SPECTER, S.; HADINKA, R. L.; YOUNG, S. A. **Clinical virology manual**. 3rd ed. New York: ASM Press, 2000.
- TEIXEIRA, J. M. S. et al. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 31, p. 1397-1403, 1998.
- VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Ateneu, 1996.