

## SOROEPIDEMIOLOGIA DE ROTAVÍRUS EM UMA POPULAÇÃO INFANTIL, GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL<sup>(1)</sup>

Ricardo ISHAK (2, 3), Alexandre da Costa LINHARES (4), Yvone GABBAY (4), Marluísa O. G. ISHAK (3, 5) e Divina D. P. CARDOSO (6)

### RESUMO

Amostras de soro de 125 crianças, com idades entre 0 e 10 anos, da população de Goiânia, Goiás, Brasil, geraram um índice de prevalência de anticorpos para rotavírus (ensaio imunoenzimático) de 82,4%. Aparentemente, o maior risco de infecção pelo vírus se dá no grupo de 1 a 3 anos. Não existe diferença de infecção de acordo com o sexo. Informações soroepidemiológicas a nível nacional, são de grande importância para o melhor conhecimento do comportamento do vírus na população em risco, principalmente quando existe a possibilidade de uma futura imuno-profilaxia. O teste imuno-enzimático em comparação com a contraímuno-eleto-osmoforese, mostrou-se mais sensível para a detecção de anticorpos para rotavírus.

### INTRODUÇÃO

A partir da descrição inicial, em 1973, por BISHOP & col.<sup>2</sup>, na Austrália, do papel dos rotavírus em casos de diarreia infantil, esses agentes tem sido largamente assinalados em todas as populações até então examinadas<sup>3,6,9,10,13,17,18,22</sup>. Em países de clima temperado tem sido mostrado que as infecções por rotavírus acometem, preferencialmente, crianças na faixa etária de 0-5 anos<sup>4,7,12</sup>.

No Brasil, os rotavírus tem sido descritos em associação com casos de gastroenterite aguda em porcentuais que variam de 21% a 33%, de acordo com o grupo populacional e a faixa etária examinada, mostrando que existe uma diferença na frequência de participação desse agente nos casos de diarreia aguda<sup>1,6,15,16</sup>. Estudos preliminares de prevalência de anticorpos para rotavírus em nosso País, já demonstraram

positividade em cerca de 61% na população de 0 — 10 anos<sup>4</sup>.

Amostras de soro de 125 crianças de 0 — 10 anos, da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil, foram testadas quanto a presença de anticorpos para rotavírus. Procurou-se ainda comparar os resultados da contraímuno-eleto-osmoforese e do ensaio imuno-enzimático, como técnicas sorológicas para detecção de anticorpos para este vírus.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### População e o meio ambiente

As 125 amostras de soro foram obtidas por punção venosa, em 1979, de crianças sem diarreia, atendidas no Laboratório de Patologia Clí-

(1) Suporte financeiro CNPq (Processo n.º 40.3228/79)

(2) Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Patologia. 66.000 — Belém — Pará, Brasil

(3) Endereço atual: London School of Hygiene and Tropical Medicine. Department of Medical Microbiology. Keppel Street. London WC1 E 7HT — England

(4) Instituto Evandro Chagas. Caixa Postal 621, 66.000 — Belém — Pará

(5) Bolsista CAPES

(6) Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical. Caixa Postal 131 — 74.000 — Goiânia — Goiás, Brasil

nica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFGO), no Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical da UFGO e laboratórios de análises clínicas privadas da cidade de Goiânia. Os soros foram preservados por congelamento a -20°C até o momento do uso. A distribuição dos soros, de acordo com a faixa etária, pode ser apreciada na Tabela I.

A população de Goiânia, está localizada em um ponto de transição climática no Brasil Central, em uma altitude média de 400 metros entre os paralelos 16° e 17° de latitude Sul e 49° e 50° de longitude Oeste<sup>8</sup>. Esta localização propicia um clima que apresenta variações sazonais no decorrer do ano, com temperaturas de calor e frio bem definidas.

### Antígeno

A cepa utilizada foi obtida através do Dr. T.H. Flewett (East Birmingham Hospital, Birmingham, Inglaterra) como uma suspensão de fezes de um bezerro ("gnotobiotic"). Este material foi diluído a 1:400 em solução salina fisiológica e, com auxílio de sonda gástrica, foram inoculados 5 ml, via oral, em novo bezerro (não "gnotobiotic") antes de receber o colostro. Espécimes fecais deste animal foram usados como antígeno para os testes sorológicos abaixo descritos, após um processo em que suspensões de fezes a 20% (em solução salina) foram homogeneizadas por sonicação durante 1,5 minuto em aparelho Ultra Sonics, modelo W-185-D, e clarificadas por centrifugação, a 5000 rpm durante 30 minutos.

### Contraímuno-eletro-osmoforese

A técnica usada foi a de SPENCE & col.<sup>21</sup>. Tris-barbital, 0,01 M, pH 8,9, filtrado em membrana de 22 nm, foi usado como solução tampão do teste. Lâminas comuns de microscopia, previamente desengorduradas em álcool absoluto, foram cobertas com 0,5 ml de uma mistura de uma parte de uma solução estoque de agarose (Seakem, Marine Colloids Inc, USA) a 2% (em água destilada) e duas partes de água destilada. Após solidificação, foi adicionada uma segunda camada de 2 ml da mistura, em quantidades iguais, de agarose a 2% e solução

tampão. As lâminas foram mantidas a 4°C até adquirirem consistência. Orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro e de 1 mm de profundidade foram feitos na camada de agarose com o auxílio de tubos capilares. Os soros, diluídos a 1:10 e 1:40 em tampão salina fosfato (PBS), foram levados a reagir com o antígeno por 90 minutos sob ação de uma corrente de 150 volts em um tanque de eletroforese Gelman. Após esse período, as lâminas foram imersas em solução salina esteril por uma noite e, a seguir, em solução de ácido tânico a 1% por 90 minutos. Os resultados positivos foram determinados pela presença de linhas de precipitação entre os orifícios contendo o antígeno e os soros testes.

### Ensaio imuno-enzimático

O procedimento utilizado foi basicamente o descrito por VOLLER & col.<sup>26</sup>. Soro de coelho anti-rotavírus, diluído a 1:10.000 em solução tampão de carbonato-bicarbonato, pH 6,9 ("Coating buffer"), foi colocado em cada orifício (100 µl) de microplacas de poliestireno, as quais foram levadas a incubação a 4°C por uma noite. Após seis lavagens (de 3 minutos cada uma) em PBS, pH 7,4, contendo Tween 20 a uma concentração final de 0,1%, v/v, (PBS/T), foi adicionado 75 µl (por orifício) de PBS/T acrescido de EDTA (concentração final de 0,01 M) e 25 µl de suspensão de antígeno de rotavírus. As placas foram incubadas a 4°C por uma noite e a seguir lavadas seis vezes em PBS/T. Em seguida, adicionou-se 100 µl do soro teste em questão, incubou-se a 37°C por 3 horas e novamente procedeu-se mais seis lavagens em PBS/T. Um volume de 100 µl de soro anti-IgG humana conjugado a fosfatase alcalina foi adicionado, incubou-se por 1,5 hora sucedendo-se novo ciclo de lavagens em PBS/T. Substrato enzimático de fosfato de para-nitrofenil (Sigma, USA) em dietanolamina a 10%, v/v, pH 9,8, foi adicionado (100 µl) e deixado reagir por 20 minutos a 37°C. A reação foi bloqueada através da adição de 50 µl de solução 3M de hidróxido de sódio. A leitura, em densidade óptica, foi realizada em micro-espectrofotômetro (Flow, ELISA-reader, Multiskan) com filtro de 405 nm. As amostras com valor maior do que 2,1 na relação valor positivo/negativo, P/N (28), foram consideradas positivas.

## RESULTADOS

Tomando-se o resultado obtido através do teste imuno-enzimático podemos apreciar na Tabela I prevalência de anticorpos para rotavírus de 82,4%. É possível evidenciarmos uma subida gradual na positividade de anticorpos, na medida em que se aumenta a faixa etária examinada. Assim é que, 52,4% (11/21) já possui imunidade para rotavírus ao completar 12 meses de idade, índice este que sobe para 70% (42/60) ao final dos cinco primeiros anos de

vida. O último grupo examinado mostra resultados negativos em apenas 10%, elevando o percentual de infecção na primeira década de vida para mais de 80%. Através das colunas do índice de percentual de positividade acumulado e pela diferença entre cada classe, nota-se que a maior parte das infecções por rotavírus se dá na faixa de 6 meses a 5 anos, sendo o grupo de 1-3 anos, o de maior risco epidemiológico. Aparentemente, não existe diferença de infecção de acordo com o sexo.

T A B E L A I

Prevalência de anticorpos para rotavírus, distribuído por idade, em uma população de crianças de Goiânia, Goiás, Brasil (1)

Idade	População examinada	Presença de anticorpos (%)	Porcentual positivo acumulado (PPA)	Diferença do PPA
0-6m	13	6 (46,2)	46,2	
6-12m	8	5 (62,5)	52,4	6,2
1-3a	20	16 (80,0)	65,8	13,4
3-5a	19	15 (78,9)	70,0	4,2
5-7a	19	18 (94,7)	75,9	5,9
7-9a	20	19 (95,0)	79,8	3,9
9-11a	26	24 (92,3)	82,4	2,6
Total	125	103 (82,4)		

(1) Anticorpos medidos através do ensaio imuno-enzimático; para detalhes técnicos veja o texto.

Na Tabela II, o teste imuno-enzimático é comparado com a CIEOF, quanto a sensibilidade na detecção de anticorpos. Os métodos concordam em 31,1% das situações (16 positivos e 17 negativos, por ambos os métodos, dos soros examinados). A primeira técnica, entretanto, revelou-se mais sensível, já que 73 amostras, negativas por CIEOF, resultaram positivas.

T A B E L A II

Comparação dos testes imuno-enzimático e contraimuno-eletro-osmoforese (CIEOF) na detecção de anticorpos para rotavírus

Imuno-enzimático	CIEOF		
	Positivo	Negativo	
Positivo	16	73	89
Negativo	0	17	17
Total	16	90	106

## DISCUSSÃO

O uso de informações geradas através de soroepidemiologia descritiva, torna-se, atual-

mente, do mais alto interesse em nosso País, quando se evidenciam esforços para o controle de diversas doenças infecciosas. Dentro deste painel, se incluem as informações sobre a prevalência dos rotavírus. É importante o conhecimento das possíveis variações regionais da ocorrência deste agente em um momento em que os esforços estão voltados para a produção de vacinas<sup>20,23,27</sup>. O uso de medidas profiláticas devem ser sempre precedidas de dados sobre o grupo populacional epidemiologicamente em risco<sup>5</sup>.

Através da Tabela I, torna-se evidente que o grupo de 6 meses — 5 anos é o mais envolvido por infecções pelo(s) rotavírus. Tomando-se por base a coluna sobre a diferença do percentual positivo acumulado, o grupo de 1-3 anos, é o que, aparentemente, mais entra em contato com o vírus na faixa etária mais próxima do nascimento. O percentual do grupo até 6 meses de idade, talvez reflita a presença de fatores antivirais específicos e inespecíficos adquiridos através do aleitamento materno<sup>19,24,25</sup>. Por outro lado, o aumento na faixa etária seguinte, talvez represente a ausência de tais fa-

tores em um grupo que já não recebe o aleitamento natural, somados as condições de higiene da população em geral, visto que a diferença de porcentual positivo acumulado não é diferente dos grupos de 3-7 anos.

No programa de aplicação de vacinas para rotavírus, é importante que informações nacionais sejam geradas para confirmar, ou não, os dados ora apresentados. É crucial que seja estimulado o conhecimento da participação desse agente na população infantil, visto que após os 9 anos, mais de 80% das crianças já foram infectadas pelo(s) rotavírus. É importante ainda, que exista uma participação do clínico, em especial do pediatra, junto ao laboratório de diagnóstico de viroses, para uma maior caracterização dos aspectos epidemiológicos da distribuição de rotavírus, a fim de que se alcance o pleno sucesso em programas futuros de profilaxia<sup>11</sup>.

Quanto aos testes sorológicos, a reação imunoenzimática foi comparada com a CIEOF. Ambos os testes requerem perícia técnica, se equivalem em economia de reagentes, segurança ao manipulador, acessibilidade de equipamentos e preços variáveis, sendo diferente apenas a CIEOF em termos de tempo de realização. Enquanto que para a detecção de antígeno nas fezes de pacientes com diarreia os dois testes apresentam resultados não muito discrepantes<sup>15</sup>, na detecção de anticorpos para rotavírus, o teste imuno-enzimático confirmou ser um método mais prático e mais sensível, tendo, talvez, como único argumento contrário, o custo do micro-espectrofotômetro para a leitura das reações em placas.

## SUMMARY

### Seroepidemiology of rotavirus in a children population, Goiânia, Goiás, Brazil.

A sample of 125 sera from children aged 0-10 years old from Goiânia, Goiás, Brazil, yielded an 82.4% prevalence rate of antibodies to rotavirus (through an enzyme immunoassay). In this study, the 1-3 year old group shows the highest risk of infection with rotavirus. No sex difference was evident. Regional seroepidemiological data is of the utmost importance in order to identify the behaviour of the virus in the population at risk, specially with the advent of a vaccine for the agent. The enzyme imu-

noassay test was compared to counterimmuno-electro-osmophoresis and was shown to be more sensitive for the detection of antibodies.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BALDACCI, E. R.; CANDEIAS, J. A. N.; BREVIGLIERI, J. C. & GRISI, S. J. E. — Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde Públ.* 13: 47-53, 1979.
2. BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H. & RUCK, B. J. — Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283, 1973.
3. BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H. & RUCK, B. J. — Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1: 149-151, 1974.
4. BLACKLOW, N. R.; ECHEVERRIA, P. & SMITH, D. H. — Serological studies with reovirus-like enteritis agent. *Infection & Immunity* 13: 1536-1566, 1976.
5. CAMARGO, M. E. — Laboratory diagnosis for seroepidemiology of Chagas' Disease. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, R.J., Brasil, 1979, pp. H7-H9.
6. CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, C. P. & RACZ, M. L. — Identificação por contraímunoeletroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde Públ.* 12: 99-103, 1978.
7. ELIAS, M. M. — Distribution of titres of rotavirus antibodies in different age groups. *J. Hyg. (Cambridge)* 79: 365-373, 1977.
8. Enciclopédia dos Municípios Brasileiros. IBGE. Rio de Janeiro, R.J., Brasil, 36: 1858.
9. FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S. & DAVIES, H. — Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497, 1973.
10. FLEWETT, T. H. & WOODS, G. N. — The rotavirus, brief review. *Arch. Virology* 57: 1-23, 1978.
11. ISHAK, R. — A racionalidade do correto diagnóstico das viroses: importância e função na área de saúde humana. *Rev. Latino-Americana Microbiol.* 23: 245-248, 1981.
12. KAPIKIAN, A. Z.; KIM, H. W.; WYATT, R. G.; CLINE, W. L.; ARROBIO, J. O.; BRANDT, C. D.; RODRIGUEZ, W. J.; SACK, D. A.; CHANOCK, R. M. & PARROTT, R. H. — Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with winter gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New Engl. J. Med.* 294: 965-972, 1976.
13. KAPIKIAN, A. Z.; KIM, H. W.; WYATT, R. G.; RODRIGUEZ, W. J.; ROSS, S.; CLINE, W. L.; PARROTT, R. H. & CHANOCK, R. M. — Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea

- and development of serological tests. *Science* 185: 1049-1053, 1974.
14. LAMPE, E.; LIBERTO, M. I. M.; VAZ, M. G. S.; MATTOS, I. G. & vonHUBINGER, M. G. — Levantamento sorológico para rotavírus, através de imunofluorescência indireta (IFI). Comunicação apresentada no 11.º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, S.C., Brasil, 1981.
  15. LINHARES, A. C.; MONÇÃO, H. C.; GABBAY, Y. B.; ARAÚJO, V. L.; SERRUYA, A. C. & LOUREIRO, E. C. B. — Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg.* 77: 384-390, 1983.
  16. LINHARES, A. C. & PINHEIRO, F. P. — Gastroenterites por rotavírus. In: *Doenças Infeciosas e Parasitárias*. Veronesi, R. (ed.). 7ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, pp. 92-94.
  17. LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A. & BEARDS, G. M. — An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Amer. J. Epidemiol.* 113: 703-710, 1981.
  18. LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MULLER, G. & PETERS, D. — Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 278-279, 1977.
  19. McLEAN, B. S. & HOLMES, I. H. — Effects of antibody, trypsin and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 13: 22-29, 1981.
  20. SOULEBOT, J. P.; DAUVERGNE, M.; BRUN, A. & ESPINASSE, J. — Protection of newborn calf against gastroenteritis with inactivated rotavirus vaccine. Comunicação apresentada na Primeira Conferência Internacional sobre o Impacto das Doenças Virais no Desenvolvimento dos Países Latino-Americanos e da Região do Caribe. Rio de Janeiro, R.J., Brasil, 1982.
  21. SPENCE, L.; FAUVEL, M.; PETRO, R. & BLOCK, S. — Comparison of counterimmuno-electrophoresis and electron microscopy for laboratory diagnosis of human reovirus-like agent associated infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 5: 248-249, 1977.
  22. SUZUKI, H. & KONNO, T. — Reovirus-like particles in jejunal mucosa of a Japanese infant with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *Tokohu J. Exper. Med.* 115: 199-211, 1975.
  23. THIND, I. S. — Immunization as a public policy — implications for developing countries. Comunicação apresentada na Primeira Conferência Internacional sobre o Impacto das Doenças Virais no Desenvolvimento dos Países Latino-Americanos e da Região do Caribe. Rio de Janeiro, R.J., Brasil, 1982.
  24. TOTTERDELL, B. M.; CHRYSTIE, I. L. & BANATVALA, J. E. — Cord blood and breast milk antibodies in neonatal rotavirus infection. *Brit. Med. J.* 1: 828-830, 1980.
  25. TOTTERDELL, B. M.; NICHOLSON, K. G.; MACLEOD, J.; CHRYSTIE, I. L. & BANATVALA, J. E. — Neonatal rotavirus infection: role of lacteal neutralising alpha<sub>1</sub>-anti-trypsin and nonimmunoglobulin antiviral activity in protection. *J. Med. Virology* 10: 37-44, 1982.
  26. VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D. — Enzyme immunoassays with special reference to ELISA technique. *J. Clin. Path.* 31: 507-520, 1978.
  27. WYATT, R. G.; KAPIKIAN, A. Z.; THORNHILL, T. S.; SERENO, M. M.; KIM, H. W. & CHANOCK, R. M. — *In vitro* cultivation in human fetal intestinal organ culture of a reovirus-like agent associated with nonbacterial gastroenteritis in infants and children. *J. Infect. Dis.* 130: 523-528, 1974.
  28. YOLKEN, R. H.; KIM, W. H.; CLEM, T.; WYATT, R. G.; CHANOCK, R. M.; KALIKA, A. R. & KAPIKIAN, A. Z. — Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 263-267, 1977.

Recebido para publicação em 21/12/1983.