

INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PATÓGENOS VIRAIS ASSOCIADOS A MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO TRATO GASTRINTESTINAL EM CRIANÇAS, NA ZONA DA MATA MINEIRA

Daniel Almeida do Valle¹
Thassia Maria da Rocha²
Vivian Honorato Barletta²
Elzimar Bellini de Toledo³
Adriana Almeida Barbosa³
Armando de Jesus do Nascimento Júnior⁴
Sandra Helena Cerrato Tibiriça⁵
Maria Luzia da Rosa e Silva⁶

RESUMO

A doença diarreica aguda de etiologia viral está associada com altas taxas de morbidade no mundo e, nos países em desenvolvimento, também à mortalidade infantil. Este trabalho objetivou detectar a presença de rotavírus, norovírus e astrovírus em casos de doença diarreica aguda, bem como as principais características epidemiológicas associadas às mesmas. Os rotavírus foram detectados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), enquanto para detecção de astrovírus e norovírus foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Das 71 amostras fecais testadas, 6 amostras (8,45%) foram positivas para rotavírus, 11 (15,49%) para norovírus e nenhuma amostra positiva para astrovírus foi detectada. Em relação à faixa etária dos indivíduos envolvidos, observou-se que as infecções por rotavírus ocorreram em crianças maiores de 24 meses e, por norovírus, em maiores de 12 meses. A análise estatística mostrou que não houve associação significativa entre o gênero do indivíduo e a ocorrência da infecção, tanto para rotavírus quanto para norovírus. Em relação à distribuição mensal dos casos positivos, observou-se ocorrência das rotavirose em junho e agosto de 2010 e em maio de 2011, meses que apresentam temperaturas mais baixas e pouca pluviosidade. Os casos de norovirose ocorreram em diferentes meses, em ambos os anos, não tendo sido observada uma tendência de sazonalidade. Os resultados comprovaram a presença e circulação desses vírus

1 Bolsista do Programa de Apoio à Consolidação de Grupos de Pesquisa da UFJF

2 Farmacêutica

3 Acadêmica do Curso de Farmácia, UFJF

4 Bolsista ProbiCjr/Fapemig

5 Professora da Faculdade de Medicina, UFJF

6 Professora Orientadora – Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF, e-mail: mluziars@yahoo.com.br

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Campus Universitário, s/nº, Cep 36036-900. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

na população e apontaram a importante participação dos mesmos, como agentes etiológicos da doença diarreica aguda infantil.

Palavras-chave: Diarreia Infantil. Rotavírus. Norovírus. Astrovírus.

INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda (DDA) é uma importante causa de morbidade em todo o mundo e também de mortalidade nos países em desenvolvimento, constituindo um grave problema de saúde pública.

A DDA é uma síndrome caracterizada por aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de consistência diminuída, podendo conter muco e sangue. A doença é autolimitada, podendo apresentar-se de forma leve, moderada ou grave (BRASIL, 2006).

A doença diarreica aguda tem uma etiologia variada, podendo ser causada por bactérias, protozoários, parasitos e vírus. Dentre os vírus envolvidos, destacam-se os rotavírus (RV), os norovírus (NoV) e os astrovírus (HAstV) (PARASHAR et al., 2003; WILHELM et al., 2003; ESTES e KAPIKIAN, 2007; WHO, 2010). Todos são transmitidos pela via fecal-oral, sendo que os principais sintomas clínicos são diarreia, vômitos, dor abdominal e febre, os quais podem se manifestar isoladamente ou em conjunto. Uma complicação importante e que pode levar ao óbito é a desidratação, que pode variar de branda à severa.

Os RV (família *Reoviridae*, gênero *Rotavírus*) possuem genoma constituído de 11 segmentos de RNA de fita dupla. São classificados em grupos (A a G), sendo que os do grupo A (RVA) são os de maior importância epidemiológica, por estarem associados à grande maioria dos casos da doença (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Um recente estudo mostrou que a frequência de diarreias associadas aos RVA, na população atendida em ambulatórios e hospitais, independente de idade, no período de 1977 a 2009, variou de 17,9% a 22,9% (LINHARES et al., 2011).

O genoma dos NoV (família *Caliciviridae*, gênero *Norovírus*) é constituído de RNA de fita simples e polaridade positiva, sendo classificados em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), dos quais GI, GII e GIV já foram detectados em humanos, acometendo indivíduos de todas as idades (ZHENG et al., 2006). A prevalência dos NoV como causa de DDA, já foi descrita em diversos países, revelando índices que variaram de 5,5% a 39,7% (O'RYAN et al., 2000; RODRIGUEZ-GUILLÉN et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008).

Os HAstV (família *Astroviridae*, gênero *Mamastrovirus*) apresentam genoma constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva (WALTER e WITCHELL, 2003). Acometem, principalmente, menores de 5 anos, mas podem ser responsáveis por surtos em adultos, idosos e imunocomprometidos (PALOMBO e BISHOP, 1996). A associação dos HAstV, em infecções nosocomiais, já foi documentada, tendo sido observada taxa de prevalência, variando de 2% a 16% (NGUYEN et al., 2007).

Os RV foram descobertos em 1973 e os resultados dos estudos levaram, rapidamente, à constatação de que apenas a adoção de medidas higiênicas não seria suficiente para impedir a ocorrência das rotavirose, já que, mesmos nos países desenvolvidos, os índices de morbidade também eram muito altos. Logo, os pesquisadores concluíram pela necessidade de desenvolvimento de uma vacina. Após algumas tentativas frustradas, finalmente a vacina Rotarix® foi liberada para uso no Brasil, sendo

introduzida no Sistema Único de Saúde (SUS), em março de 2006 (BRASIL, 2006). Desde então, estudos epidemiológicos têm sido realizados por vários pesquisadores, visando avaliar o impacto da introdução da amostra vacinal, na população infantil (ANDREASI et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008b; MORILLO et al., 2010; GÓMEZ et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência da infecção por RV, NoV e HAstV, na região de Juiz de Fora, no período de janeiro de 2010 a agosto de 2011, bem como avaliar a influência de fatores demográficos na ocorrência e na distribuição temporal das mesmas.

METODOLOGIA

Para este estudo, foram testados 71 espécimes fecais diarreicos, provenientes de pacientes, em sua maioria com idade entre 0 a 5 anos, obtidos no período de janeiro de 2010 a julho de 2011, na região de Juiz de Fora, MG. Este projeto de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética de Pesquisas em Humanos (CEPH), da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o parecer nº 058/2010.

Suspensões fecais a 10%, preparadas em tampão Tris-Ca-HCl, pH 7,2 e clarificadas (10min - 5000 rpm) foram submetidas à técnica de extração do ácido nucleico viral, descrita por Boom et al. (1990). O sobrenadante contendo o genoma extraído foi submetido, primeiramente, à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), para visualização dos 11 segmentos de RNA genômico, o que permite assim, a detecção de RV (LAEMMLI, 1970; HERING et al., 1980). As amostras negativas para RV foram então, submetidas à técnica da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), para a detecção de NoV e HAstV, segundo os protocolos de FANKHAUSER et al. (2002) e NOEL et al. (1995), respectivamente.

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS versão 13.0 e o Teste Qui-Quadrado, estabelecendo-se como significativo um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2010 a julho de 2011, foram analisadas 71 amostras, tendo sido identificados em 23,94% (17/71) delas, pelo menos, um dos agentes virais pesquisados. Foram detectadas 6 amostras positivas para RV (8,45%), sendo 5 em 2010 e 1 em 2011. A positividade de NoV foi de 15,49% (11/71), tendo sido detectadas 5 amostras positivas em 2010 e 6 em 2011. Não houve detecção de HAstV no período estudado (Tab. 1).

Tabela 1 - Detecção de RVA, NV e HAstV entre jan 2010 – ago 2011, em Juiz de Fora, MG.

Testadas		RV		NoV		HAstV	
		Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
2010	57	5	8,77%	5	8,77%	-	-
2011	14	1	7,14%	6	42,86%	-	-
Total	71	6	8,45%	11	15,49%	-	-

Os resultados mostraram que, no período estudado, houve uma maior prevalência dos NoV (15,49%), seguidos dos RV (8,45%), diferentemente do observado em períodos anteriores a 2007, quando a ocorrência de infecções por RV era maior que a dos demais vírus entéricos aqui pesquisados (FERREIRA, 2010). Coincidência ou não, essa mudança corresponde à implantação da vacina anti-RV (Rotarix®), no Plano Nacional de Imunização, através do qual, todas as crianças aos 2 e aos 4 meses de idade, podem tomar a vacina nas unidades de saúde, em todo o território nacional (BRASIL, 2006).

A prevalência de HAstV normalmente é baixa e a ausência de detecção dos mesmos neste trabalho, provavelmente, reflete o pequeno número de amostras testadas.

Com relação à distribuição das amostras positivas, por faixa etária (Tab. 2), observou-se a ausência de ocorrência de infecções por RV, em crianças menores de 2 anos, o que pode sugerir que, provavelmente, tenham sido protegidas pela vacinação. Em relação às norovirozes, foi observado que as infecções ocorreram numa ampla faixa etária, com exceção de menores de 12 meses (Tab. 2).

Tabela 2 - Distribuição das amostras positivas, detectadas no período 2010-2011, conforme o gênero e a faixa-etária.

		<i>Rotavírus</i>	<i>Norovírus</i>	<i>Astrovírus</i>	<i>Total</i>
Sexo	Masculino	12,12% (4/33)	9,09% (3/33)	-	21,21% (7/33)
	Feminino	6,06% (2/33)	21,21% (7/33)	-	27,27% (9/33)
	Não Informado	-	20% (1/5)	-	20,00% (1/5)
Idade	< 12 meses	-	-	-	0,00% (0/8)
	12 – 23 meses	-	18,18% (2/11)	-	18,18% (2/11)
	24 – 47 meses	12,50% (1/8)	12,50% (1/8)	-	25,00% (2/8)
	48 – 59 meses	20,00% (1/5)	20,00% (1/5)	-	40,00% (2/5)
	≥ 60 meses	6,90% (2/29)	17,24% (5/29)	-	24,14% (5/29)
	Não Informado	20,00% (2/10)	20,00% (2/10)	-	40,00% (7/10)
Total		8,45% (6/71)	15,43% (11/71)	-	23,94% (17/71)

A análise da ocorrência da infecção, por gênero (Tab.II), mostrou que não houve influência desse na ocorrência da DDA, tanto associada aos RV ($p=0,392$), quanto aos NoV ($p=0,170$).

A distribuição mensal das amostras positivas para RV (Fig. 1), no período estudado, permitiu identificar uma tendência de sazonalidade da infecção. Os resultados apontaram uma maior incidência das rotavirozes nos meses de maio e agosto, período do ano, em Juiz de Fora, que apresenta, geralmente, temperaturas baixas e pouca pluviosidade, corroborando estudos anteriores, realizados nessa mesma região (ROSA e SILVA et al. 2001; ROSA e SILVA et al. 2002).

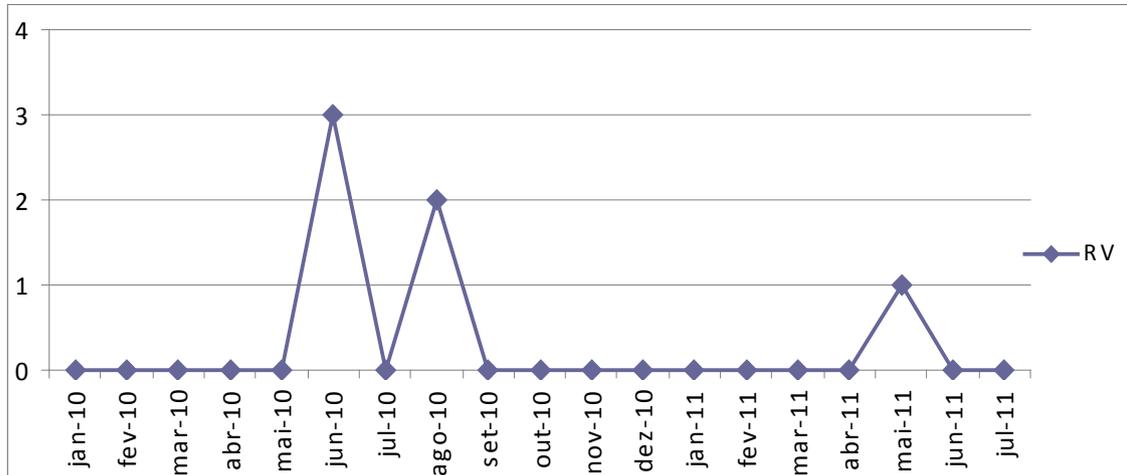


Figura 1 - Distribuição mensal de RV entre janeiro de 2010 e julho de 2011

Por outro lado, a análise da distribuição mensal das amostras positivas para NoV (Fig. 2), mostrou que, no ano de 2010, eles foram detectados entre os meses de janeiro e março e em 2011, nos meses de março e abril e, depois em junho e julho, não tendo sido observada, portanto, tendência de sazonalidade. Vários estudos sobre os NoV, realizados em diferentes anos, mostraram que esse aspecto da infecção ainda é controverso, com relatos de ocorrência ou não de perfil sazonal (PARASHAR et al., 2004; VICTORIA et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008a; BARREIRA et al., 2010).

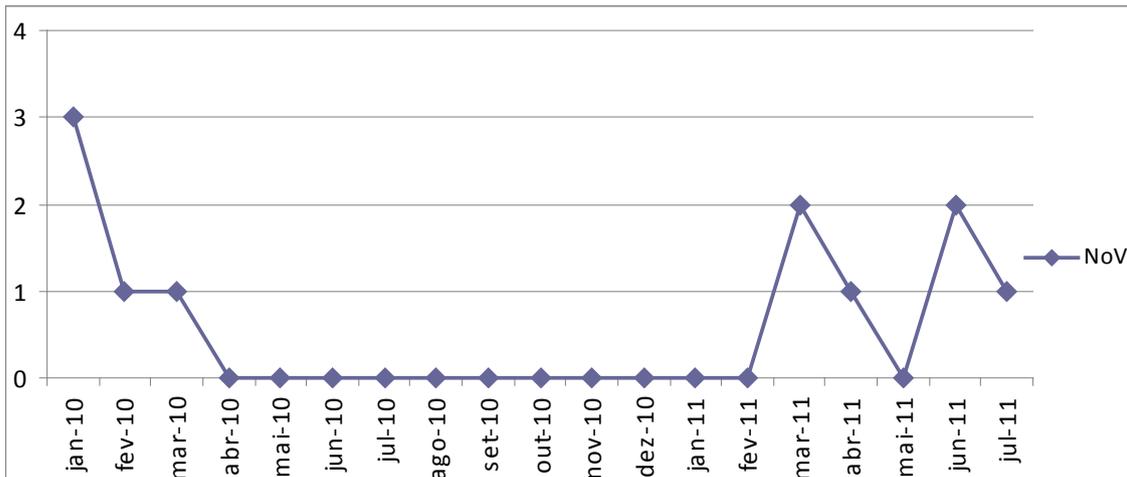


Figura 2 - Distribuição mensal de NoV entre janeiro de 2010 e julho de 2011

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de RV foi de 8,45% e de NV de 15,49%, não tendo sido detectada a presença de HAstV.

Em relação à faixa etária dos indivíduos envolvidos, observou-se uma maior prevalência das DDA, associadas aos RV, em crianças maiores de 24 meses, enquanto a infecção por NoV ocorreu em crianças maiores de 12 meses.

As análises estatísticas mostraram não haver diferença significativa quando comparado o gênero do indivíduo e a ocorrência da infecção, tanto pelos RV quanto pelos NoV.

Em relação à distribuição mensal dos casos positivos, as infecções associadas aos RV apresentaram uma tendência de sazonalidade, diferentemente do que foi observado para os NoV.

A continuidade dos estudos sobre essas viroses é fundamental, não só para se conhecer a epidemiologia das mesmas, como também para conhecer aspectos desses vírus, dados que podem ser utilizados para estruturar futuras estratégias de prevenção, visando minimizar os impactos que essas síndromes representam, na morbi-mortalidade infantil.

EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF VIRAL PATHOGENS ASSOCIATED WITH INFANTILE GASTROENTERITIS

ABSTRACT

This study aimed to detect the presence of rotavirus, norovirus and astrovirus in cases of infantile gastroenteritis and to assess the major epidemiologic features of these infections. The rotavirus detection was performed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and astrovirus and norovirus detection was carried out by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). From 71 fecal samples tested, 6 (8,45%) were found to be positive for rotavirus and 11 (15,49%) for norovirus. There was no positive sample for astrovirus in the study group. About the age of the analyzed populace, rotavirus infections occurred mainly in children older than 24 months; norovirus, older than 12 months. No significant difference was identified between gender and infection for norovirus and rotavirus. Analyzing the occurrence of these viruses along the year, a higher prevalence of rotaviruses was observed on July and August of 2010 and May of 2011. As seen in this study, these viruses play an important role in the diarrheal disease and it's very important the realization of continuous prospective epidemiological surveillance to monitoring viruses associated with this disease.

Keywords: Diarrhea Infantile. Rotavirus. Norovirus. Astrovirus.

REFERÊNCIAS

ANDREASI, M.S.A. et al. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 4, p. 411-414, 2007.

BARREIRA, D.M. et al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Virology*, v. 47, p. 60-64, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico. *Doença diarreica por rotavírus*. Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH. Brasília: Editora MS, 2006.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: GRIFFIN, D.E. et al. (Eds.), *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. p. 1917-1974.

FANKHAUSER, R.L. et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 1-7, 2002.

FERREIRA, A. S. *Caracterização de amostras de rotavírus circulantes em Juiz de Fora, MG, no período de 2005 a 2006*. 2010. 76 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

GÓMEZ, M. M. et al. Rotavirus A Genotype P[4]G2: Genetic Diversity and Reassortment Events Among Strains Circulating in Brazil Between 2005 and 2009. *Journal of Medical Virology*, v. 83, p. 1093–1106, 2011.

HERING, A.J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LINHARES, A.C. et al. Rotavirus's burden and types in Latin America: systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, v. 21, p. 89–109, 2011.

MORILLO, S.G. et al. Caracterização de genótipos de rotavírus em creches: era pré- e pós-vacinação contra o rotavírus. *Journal de Pediatria*, v. 86, n. 2, p. 155-158, 2010.

NAKAGOMI, T. et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Archives Virology*, v. 153, n. 5, p. 957-60, 2008.

NAKAGOMI, T. et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Archives of Virology*, v. 153, p. 591–593, 2008.

NGUYEN, T.A. et al. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Virology*, v. 79, n. 5, p. 582-590, 2007.

NOEL, J. S. et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 797-801, 1995.

O'RYAN, M. et al. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 182, p. 1519-1522, 2000.

- PALOMBO, E.A.; BISHOP, R.F. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 7, p. 1750-1753, 1996.
- PARASHAR, U.D. et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.
- PARASHAR, U.D. et al. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 190, p. 1088-1092, 2004.
- RIBEIRO, L.R. et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 201-206, 2008.
- RODRIGUEZ-GUILLÉIN, L. et al. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *Journal of Clinical Virology*, v. 33, p. 104-109, 2005.
- ROSA e SILVA, M. L.; CARVALHO, I. P.; GOUVEA, V. 1998-1999 Rotavirus Seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 8, p. 2837-2842, 2002.
- ROSA e SILVA, M. L.; NAVECA, F. G.; CARVALHO, I. P. Epidemiological Aspects of Rotavirus Infections in Minas Gerais, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, n. 4, p. 215-222, 2001.
- VICTORIA, M. et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 26, p. 602-606, 2007.
- WALTER, J.E.; MITCHELL, D.K. Astrovirus infection in children. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 16, p. 247-253, 2003.
- WILHELM, I. et al. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9, p. 247-262, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoea: Why children are still dying and *what can be done*. Geneva: 2009. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598415_eng.pdf>. Acesso em 11 nov. 2010.
- ZHENG, D.P. et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, v. 346, p. 312-323, 2006.