

INVESTIGAÇÃO DE PATÓGENOS VIRAIS ASSOCIADOS À GASTRENERITE INFANTIL AGUDA

INVESTIGATION OF VIRUSES ASSOCIATED WITH INFANT ACUTE GASTROENTERITIS

Vívian Honorato Barletta¹; Rafaella Almeida Lima²; Andrêssa Silvino Ferreira³
Raphaella Honorato Barletta⁴.; Thais Aparecida Vieira Reis⁵.; Alice Kappel Roque⁶;
Sandra Helena Cerrato Tibiriça⁷, Iná Pires de Carvalho⁸ & Maria Luzia da Rosa e
Silva⁹

¹ Farmacêutica, e-mail: vivianhbarletta@yahoo.com.br;

² Farmacêutica, e-mail: rafaella_aln@yahoo.com.br;

³ Acadêmica do curso de Farmácia/UFJF, e-mail: andressasilvino@yahoo.com.br;

⁴ Acadêmico de Ciências Biológicas/UFJF, e-mail: faelabarletta@yahoo.com.br;

⁵ Acadêmico de Ciências Biológicas/UFJF, e-mail: thaisavr@hotmail.com;

⁶ Acadêmica do curso de Farmácia/UFJF, e-mail: kappelroque@yahoo.com.br;

⁷ Doutora/Faculdade de Medicina-UFJF, e-mail: tibi@interfire.com.br;

⁸ Doutora/Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: inapirescarvalho@yahoo.com.br;

⁹ Doutora e pesquisadora responsável/ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF), e-mail: mluziars@yahoo.com.br. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Campus Universitário, s/nº, Cep 36036-900. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A gastroenterite de etiologia viral está associada com altas taxas de morbidade, no mundo, sendo nos países em desenvolvimento, responsável também, por altos índices de mortalidade infantil. Este trabalho objetiva detectar a presença de rotavírus, adenovírus e astrovírus em casos de doença diarréica, acompanhar a dinâmica populacional dos rotavírus e avaliar a prevalência e a sazonalidade dessas infecções. A detecção de rotavírus e adenovírus foi realizada através da técnica de ensaio imunoenzimático (EIE). As amostras de rotavírus foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para avaliação dos perfis eletroforéticos e acompanhamento da dinâmica populacional. A detecção de astrovírus foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Das 338 amostras fecais testadas para rotavírus, foram detectadas 61 positivas (18,04%). A análise eletroforética mostrou a circulação de amostras com perfis característicos de rotavírus do grupo A, todos longos em 2005 e longos e curtos, com predominância dos últimos, em 2006. Das 316 amostras testadas para a presença de adenovírus e das 131 testadas para astrovírus, foram detectadas 17 (5,38%) e 2 (1,53%), respectivamente. Os resultados demonstram a participação destes vírus em casos de gastroenterite infantil e apontam para a importância da continuidade deste estudo.

Palavras-chave: gastroenterite, rotavírus, adenovírus, astrovírus, EGPA, EIE, RT-PCR.

Abstract

This study aimed to detect the presence of rotavirus, adenovirus and astrovirus in cases of gastroenteritis in children; assess the prevalence and seasonality of these infections and characterize the samples of rotavirus detected. Fecal specimens were obtained from children from 0 to 5 years, suffering of gastroenteritis in Juiz de Fora city, during 2005 and 2006. The detection of rotavirus and adenovirus was performed by enzyme immunoassay technique (EIARA). The positive rotavirus samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for molecular characterization. The detection of astrovirus was carried out by polymerase chain reaction (RT-PCR). From 338 fecal samples tested for rotavirus, 61 were found to be positive (18.04%). The electrophoretic analysis showed samples with characteristic profiles of the group A rotavirus. In 2005, all rotavirus strains presented long profile, in 2006 long and short profiles. Of the 316 samples tested for presence of adenovirus, 17 were positive (5.38%). Of the 131 samples tested for the presence of astrovirus 2 were positive (1.53%). As seen in this study, these enteroviruses are prevalent in infant diarrhea and may play important role in the disease development reinforcing the need of prospective epidemiological surveillance.

Keywords: gastroenteritis, rotavirus, adenovirus, astrovirus, EGPA, EIARA, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma causa importante de morbidade infantil, em todo o mundo. Estima-se que, em todos os anos, ocorram aproximadamente 700 milhões de casos de diarreia aguda, em crianças menores de três anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento. Nestes, as taxas de mortalidade infantil também são altas, sendo a doença considerada um grave problema de saúde pública (PARASHAR et al., 2003, p.565).

Dentre os vírus de maior relevância na gênese da gastroenterite infantil aguda encontram-se os rotavírus, adenovírus entéricos e os astrovírus.

Os rotavírus destacam-se como os principais responsáveis por infecções associadas a diarreias severas, principalmente em crianças (RIBEIRO et al., 2008, p.201). Estima-se que, em todo o mundo, mais de 90% das crianças com idade inferior a três anos são infectadas, pelo menos uma vez, com rotavírus, resultando em 440.000 mortes todos os anos (WILHELMI, ROMAN & SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003, p. 247; PARASHAR et al., 2003, p.565). Esse fato tem feito com que os rotavírus sejam extensivamente estudados, na busca pelo entendimento de sua patogenicidade e de formas de controle das infecções por eles causadas. No Brasil, as infecções por rotavírus em crianças com idade inferior a cinco anos são responsáveis por 4.000 mortes todos os anos (FAPESP, 2006, p.61).

Os rotavírus são vírus não envelopados que pertencem à família *Reoviridae* e são classificados em sete grupos antigênicos (A - G). Os rotavírus dos grupos A, B e C estão associados a infecções em humanos, sendo os do grupo A os de maior importância epidemiológica (GLASS et al., 2006, p.323; PARASHAR et al.,

2003, p.565). Os rotavírus são os únicos agentes infecciosos conhecidos de vertebrados, que apresentam 11 segmentos de RNA de fita dupla, os quais são facilmente separados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). A análise eletroforética do genoma é uma técnica muito usada para a detecção dos rotavírus, permitindo monitorar, em surtos da doença, a dinâmica da circulação das amostras virais (CARDOSO et al., 2003, p.25).

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, cujas partículas não possuem envelope e o genoma é constituído de DNA de fita dupla. Apresentam uma grande variabilidade genética, o que possibilitou a sua classificação em diferentes espécies e sorotipos (LEES, 2000, p. 83). Os sorotipos não entéricos são responsáveis por infecções respiratórias e do globo ocular, e os sorotipos entéricos, 40 e 41, são os mais freqüentemente associados às gastroenterites humanas. Em comparação com as infecções causadas por rotavírus, os adenovírus geralmente causam diarreia menos severa, porém por um período mais prolongado, podendo persistir por semanas (SOARES et al., 2002, p. 171). As taxas de detecção de adenovírus entéricos associados à diarreia infantil são variáveis, sendo que nos países em desenvolvimento, têm sido relatados valores entre 2% a 31% (MAGALHÃES et al., 2007, p.555-557).

O ensaio imunoenzimático (EIE) realizado com anticorpos monoclonais específicos, revelou-se um método prático, sensível e específico para a detecção dos adenovírus entéricos e suas eventuais variantes antigênicas. Além de permitir estudos de cunho epidemiológico em larga escala, possibilita a identificação do antígeno viral diretamente nas fezes (PEREIRA et al., 1985, p. 21-28).

Os astrovírus são vírus não envelopados, cujo genoma é constituído de uma molécula de RNA de fita simples, classificados na família *Astroviridae*. À microscopia eletrônica, a partícula viral apresenta uma característica configuração estrelar. As infecções provocadas pelos astrovírus acometem, principalmente, crianças menores de cinco anos de idade (WALTER & MITCHELL, 2003, p.247).

No Brasil, a introdução de técnicas diagnósticas, tais como o EIE e o RT-PCR, permitiu um avanço na detecção destes vírus e, em diversas oportunidades, sua presença pode ser confirmada nos casos estudados, com índices que variaram de 2,8% a 33% (GABBAY et al., 2007, p. 534-535; VICTORIA et al., 2007, p. 939-44).

Tendo em vista a relevância epidemiológica dos casos de gastroenterites associadas a estes agentes enterais, as altas taxas de morbidade, e os significantes gastos relacionados aos casos de diarreias causadas por estes agentes etiológicos, é importante o desenvolvimento de estudos da ocorrência destas viroses, não só para conhecer a situação em Juiz de Fora, Minas Gerais, mas também para ampliar o conhecimento da circulação destes vírus no Brasil. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo detectar a presença de rotavírus, adenovírus e astrovírus em casos da doença, acompanhar a dinâmica populacional dos rotavírus detectados e avaliar a prevalência e a sazonalidade dessas infecções.

2. METODOLOGIA

Espécimes fecais foram obtidos de crianças de 0 a 5 anos, com quadro de gastroenterite, atendidas em unidades de saúde das redes pública e privada, de Juiz de Fora, no período de 2005 a 2006. Suspensões fecais a 10% em tampão Tris-

HCl-Ca⁺², pH 7,2, clarificadas (5000 rpm/2min) foram submetidas à técnica de ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus (EIARA). Com exceção das amostras positivas para adenovírus, as demais foram, a seguir, submetidas à técnica de extração do RNA viral, descrita por Boom e colaboradores (1990). Os sobrenadantes contendo RNA viral das amostras positivas para rotavírus foram submetidos à EGPA (LAEMMLI, 1970, p.680; HERRING et al, 1980, p.473) para a obtenção dos perfis de migração do RNA para o estudo fenotípico dessas amostras.

A detecção de astrovírus foi realizada através da técnica de PCR, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), descrita por Jiang e colaboradores (1993, p. 10539).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 338 amostras fecais testadas para rotavírus, foram detectadas 61 positivas, sendo 18/105 (17,1%) em 2005 e 43/233 (18,4%) em 2006, com índice de positividade de 18,04% no período pesquisado. Para a detecção de adenovírus, 316 amostras foram testadas por EIARA, tendo sido encontradas 17 positivas, sendo 4/84 (4,76%) em 2005 e 13/232 (5,6%) em 2006, com total de positividade de 5,38% no período pesquisado. Em relação aos astrovírus, das 131 amostras testadas foram detectadas duas positivas (1,53%), sendo 1/14 (7,14%) em 2005 e 1/117 (0,85%) em 2006, com total de positividade de 1,53% no período pesquisado (Figura 1).

A análise da distribuição mensal das amostras positivas para rotavírus, em 2005 foi irregular, refletindo também a irregularidade na obtenção das amostras.

Já em 2006, a maioria delas foi detectada entre julho e agosto, meses mais frios e secos do ano em Juiz de Fora, corroborando estudos anteriores realizados nesta região (ROSA e SILVA et al. 2002, p.2841), que apontaram a sazonalidade desta infecção (Figuras 2 e 3).

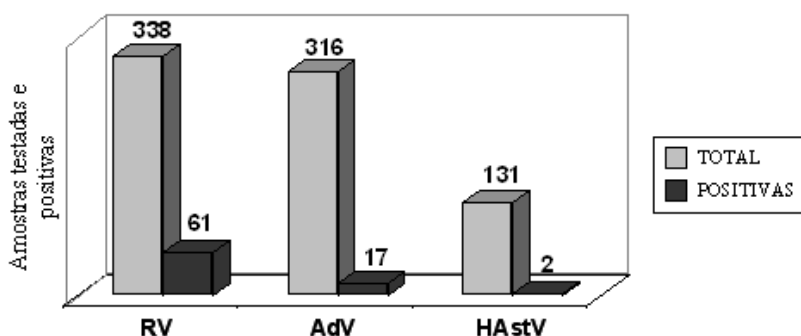


Figura 1: Distribuição das amostras de RVA, ADV e HAstV detectadas nos anos de 2005 e 2006.

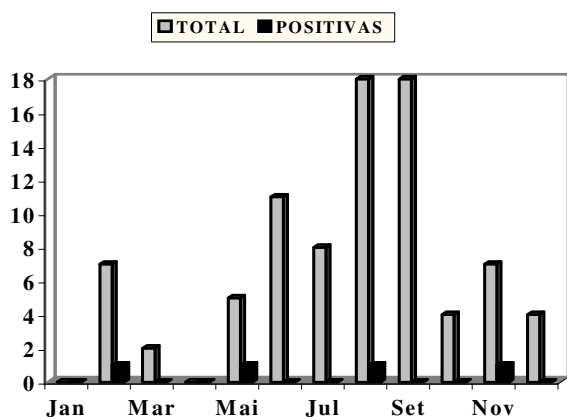


Figura 2: Distribuição mensal das amostras positivas de RTV, 2005.

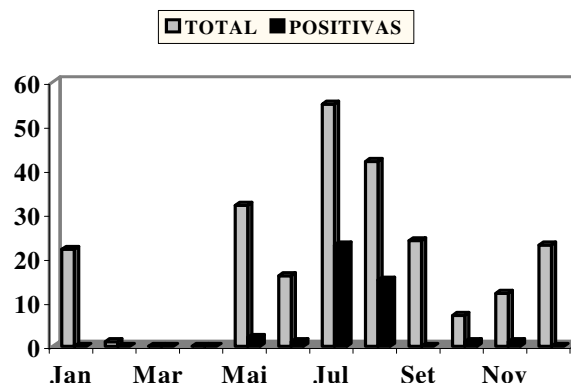


Figura 3: Distribuição mensal das amostras positivas de RTV, 2006.

No que diz respeito aos adenovírus, estes foram detectados em meses com características climáticas diferentes, portanto não apresentando sazonalidade. A avaliação para os astrovírus não foi possível, devido ao pequeno número de amostras positivas detectadas neste período.

A análise eletroforética mostrou a circulação de amostras com perfis presuntivos de rotavírus do grupo A, o qual é responsável por 95% das infecções em humanos (GLASS et al. 2006, p.330). Em 2005, todas as amostras apresentaram perfil longo e em 2006, perfis longos e curtos, com predominância dos últimos (Figura 4).

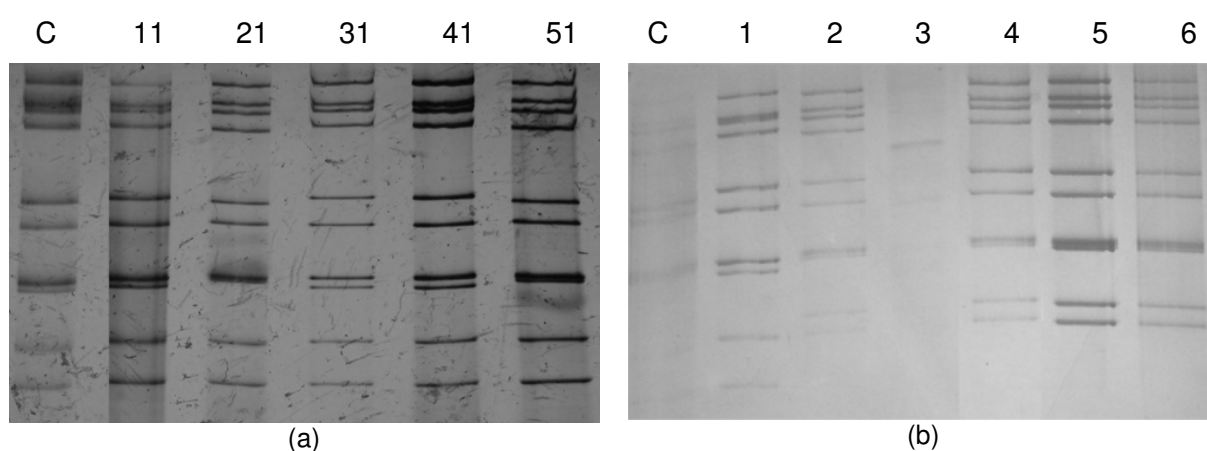


Figura 4: a) perfis de migração do RNA viral de amostras de rotavírus detectadas em 2005.

C (amostra controle, de perfil longo); 1-5 (eletroforétipos diferentes, perfil longo);

b) Perfis de migração do RNA de amostras de rotavirus detectadas em 2006: C (amostra controle, perfil longo); 1 (perfil longo); 2, 3, 4, 5 e 6 (perfis curtos).

Assim, foi possível evidenciar uma mudança do padrão de ocorrência dos perfis eletroforéticos, revelando a variabilidade das amostras circulantes de rotavírus em Juiz de Fora, neste período.

Este estudo abrangeu um período anterior à implantação da vacina (2005), e o ano da introdução da mesma no Programa Nacional de Imunizações no Brasil (2006). Não foi observada, neste estudo, uma diferença significativa da detecção dos rotavírus nos anos de 2005 e 2006. Possivelmente, este achado pode estar relacionado à recente implantação da vacina durante o período estudado, o

que reforça a necessidade de monitoramento dos casos de diarreia aguda nos anos seguintes, e a realização de mais estudos visando avaliar o impacto pós-vacinal.

Esse achado corrobora as demais pesquisas realizadas no Brasil, que demonstraram que os adenovírus entéricos foram agentes etiológicos responsáveis por 2 a 31% dos casos de doença infantil diarreica. Além disso, este estudo foi pioneiro na região para a detecção dos adenovírus entéricos, tendo permitido esclarecer a etiologia de casos de gastroenterite, avaliados em pesquisas anteriores para rotavírus. Não foi observado um perfil sazonal na ocorrência das infecções pelos adenovírus, o que é condizente com outros estudos realizados no Brasil (MAGALHÃES et al., 2007, p.556).

A maioria das amostras positivas para rotavírus e adenovírus foi encontrada em crianças com até 24 meses de idade, reafirmando dados da literatura, de pesquisas realizadas na região sudeste do Brasil (SOARES et al., 2002, p. 175; ROSA e SILVA et al. 2002, p.2839).

As pesquisas para astrovírus são recentes e escassas no Brasil, tendo sido implantada recentemente, em Juiz de Fora. Esse achado foi menor do que os dados encontrados na literatura, segundo os quais, os astrovírus são agentes etiológicos responsáveis por 2,8 a 33% dos casos de doença infantil diarreica, nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (GABBAY et al., 2007, p.537). Vale ressaltar, entretanto, que estes estudos utilizaram uma amostragem muito maior que a utilizada neste estudo.

A pesquisa de agentes virais envolvidos em casos de doença diarreica infantil é importante para elucidar a etiologia e fornecer dados para vigilância

epidemiológica que possibilitem intervenções públicas, no sentido da melhora da qualidade de vida, tratamento e medidas de controle dessas infecções.

4. CONCLUSÃO

Ao longo deste estudo, foi possível investigarmos a ocorrência, bem como obtermos informações sobre a circulação de rotavírus, adenovírus e astrovírus, no que tange aos aspectos epidemiológicos e moleculares. O presente estudo reforça a importância do envolvimento destes vírus em casos brandos e severos de doença diarreica infantil. Dada a relevância das gastroenterites virais em todo o mundo, verifica-se a importância de estudos como este, que revelam a prevalência e flutuação das amostras virais circulantes em nosso meio. Essas informações contribuem ainda para a formação de uma base de dados, importante para a vigilância epidemiológica, e possivelmente, para o desenvolvimento das políticas públicas de saúde na região. Além disso, reforça a necessidade de estudos longitudinais na nossa região, a fim de que se conheçam melhores estratégias para a prevenção e minimização dos impactos que estas síndromes representam na morbidade e internações hospitalares infantis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO DD, SOARES CM, DIAS E SOUZA MB, DE AZEVEDO MS, MARTINS RM, QUEIROZ DA, DE BRITO WM, MUNFORD V, RACZ ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98: 25-29, 2003.
- FAPESP: **Ciência e Tecnologia no Brasil**. São Paulo: Fapesp, n.120, p.61, fev 2006.
- GABBAY YB; LINHARES AC; CAVALCANTE-PEPINO EL; NAKAMURA LS; DA SILVA LD; MASCARENHAS JD; OLIVEIRA DS; LEITE JP. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in BÉlem, Brazil. **J Med Virol**, May;79(5): 530-8, 2007.

- GLASS RI, PARASHAR UD, BRESEE JS, TURCIOS R, FISCHER TK, WIDDOWSON MA, JIANG B, GENTSCH JR. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet** 368: 323-332, 2006.
- HERRING, A.J, INGLIS, N.F., OJEH, C.K., SNODGRASS, D.R. & MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**,16(3): 473-477, 1982.
- JIANG B, MONROE SS, KOONIN EV, STINE SE, GLASS RI. RNA sequence of astrovirus : distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 10539-10543,1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685, 1970.
- LEES, D. N. Viruses and bivalve shellfish - **Intern. J. of Food Microb.**, 59: 81-116, 2000.
- MAGALHÃES, G.F; NOGUEIRA, P.A; ANDRÉA FAGUNDES GRAVA, A.F; PENATI, M.; SILVA, L.H. P; ORLANDI, P. P. MAGALHÃES, G.F; NOGUEIRA, P.A; ANDRÉA FAGUNDES GRAVA, A.F; PENATI, M.; SILVA, L.H. P; ORLANDI, P. P. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, V.102, n.5,Rio de Janeiro, 2007. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 102(5): 555-557, 2007.
- PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A. AND GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, n.5, p.565-572, 2003.
- RIBEIRO, LR, GIUBERTI, RSO, BARREIRA DMPG, SAICK KW, LEITE, JPL, MIAGOSTOVICH1, MP; SPANO, LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 103(2): 201-206, 2008.
- ROSA E SILVA ML, CARVALHO I.P., GOUVEA, V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. **J Clin Microbiol** 40: 2837-2842, 2002.
- SOARES, C.C.; VOLOTÃO, E.M.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; SILVA, F.M.; CARVALHO, T.R.B.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.; SANTOS, N. – Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **J. Clin. Virol.**,23: 171-177, 2002.
- PEREIRA HG, AZEREDO RS, LEITE JPG, ANDRADE ZP, CASTRO L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J Virol Methods** 10: 21-28,1985.
- VICTORIA M, CARVALHO-COSTA FA, HEINEMANN MB, LEITE JP, MIAGOSTOVICH MP. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Virol**. Jul;79(7):939-44, 2007.
- WALTER JE & MITCHELL DK. Astrovirus infection in children. **Curr Opin Infect Dis** 16: 247-253, 2003.
- WILHELMI, I.; ROMAN, E. & SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and infection**, v. 9, n. 4, pp. 247-262, apr 2003.