

IDENTIFICAÇÃO POR CONTRAIMUNOELETROFORESE DE ROTAVIRUS EM CASOS DE DIARRÉIA INFANTIL *

J. A. N. Candeias **
Cornélio P. Rosenberg ***
M. L. Rácz **

RSPUB9/398

CANDEIAS, J. A. N. et al. *Identificação por contraimunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 12:99-103, 1978.

RESUMO: Os resultados obtidos na identificação de rotavírus, usando a técnica da contraimunoelctroforese, com 162 amostras de fezes de crianças com quadros diarréicos agudos, mostram uma distribuição percentual de positividade de 72,7%, 77,7% e 66,6% em diferentes grupos etários de 6 a 8 meses até um ano de idade.

UNITERMOS: Rotavírus (Orbivirus). Imunoelctroforese. Diarreia infantil.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite infantil não bacteriana, gastroenterite viral infantil, ou gastroenterite viral B é uma entidade etiologicamente bem definida, em que partículas virais de 65 a 75 nm têm sido, encontradas na maior parte dos pacientes por microscopia eletrônica, quando examinados os extratos fecais por esta técnica^{5-8,12,13,16,22,27,31,33}.

Estas partículas são hoje conhecidas pela designação de rotavírus¹⁴. Estudos feitos por Kapikian e col.²², utilizando a reação de fixação do complemento, demonstraram ser os rotavírus agentes relativamente ubíquos, pelo menos, nas áreas em que aqueles autores fizeram os levantamentos sorológicos. Os rotavírus podem infectar,

além do homem, outros animais, como bovinos^{25,37}, equinos^{15,39}, ovinos³², porcinos³⁸, murinos^{1,28} e leporinos⁹, já sendo possível identificar de que espécie foram isolados utilizando-se provas de neutralização³⁴. Utilizando como antígeno, uma cêpa bovina de rotavírus (N. C. D. V.), Kapikian e col.²¹ demonstraram, sorologicamente, a infecção de crianças por rotavírus humanos. Esta relação antigênica entre rotavírus humanos e bovinos tem aplicações práticas de grande valia, considerando-se a viabilidade de replicação dos rotavírus bovinos em culturas celulares. Os métodos de diagnóstico utilizados para a identificação de rotavírus vão desde a visualização

* Pesquisa financiada pelo Departamento de Assistência à Infância e Maternidade da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de São Paulo.

** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

*** Do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

das partículas virais por microscopia eletrônica^{7,16} e imunoelctromicroscopia²¹; até à identificação de antígenos por imunofluorescência², e contraímunoeletroforese^{3,37}; a pesquisa de anticorpos pode ser feita por fixação do complemento²¹, neutralização⁶ e imunofluorescência.²⁹

No presente trabalho apresentam-se os resultados obtidos com a utilização da técnica da contraímunoeletroforese no diagnóstico da gastroenterite viral B.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de fezes

Foram estudadas 164 amostras de fezes obtidas de crianças com quadros diarreicos agudos. A colheita foi feita com zaragatoa estéril conservada em meio de transporte especial*, os extratos para exame foram preparados segundo técnica descrita por Bishop e col.³ e conservados a -20° C, até ulterior utilização.

Soro anti-rotavírus

A cêpa "Compton-England" de vírus da diarreia de vitelos, cedida pelo Dr. T. H. Flewwitt, foi cultivada em culturas de rim de bovino e purificada pela técnica de Bishop e col.³, sem ultracentrifugação em gradiente de sacarose. O material obtido, depois de misturado com adjuvante completo de Freund, foi utilizado para a imunização de cobaias, por via subcutânea, em três inoculações de 0,5 ml com 15 dias de intervalo; o soro obtido na sangria de prova, feita no 45º dia, permitiu estabelecer a identidade dos anticorpos frente a extratos fecais humanos com provas de difusão em agar positivas para um soro padrão anti-rotavírus, para soros humanos convalescentes, oriundos de casos de gastroenterite infantil e para soros de bovinos adultos com anticorpos precipitantes para a cêpa "Compton-England".

Contraímunoeletroforese

A contraímunoeletroforese foi feita em lâminas de vidro (5,0 x 7,5 cm) cobertas com 6 ml de agar a 0,9%, preparado em tampão de veronal acetato pH 8,6 e força iônica igual a 0,1 μ . Em cada lâmina foram feitas depressões com diâmetro de 3 mm, separadas entre si de uma distância de 3 mm, de modo a obter-se um padrão de duas fileiras duplas de 6 depressões; em cada lâmina podiam, deste modo, testar-se 12 extratos de fezes. As amostras de soro específico, depois de inativadas a 56°C, durante 5 min., foram colocadas nas depressões dispostas do lado do ânodo, enquanto os extratos de fezes, não diluídos, foram colocados do lado do cátodo. A contraímunoeletroforese foi feita com uma corrente constante de 12mA por lâmina, durante um período de 60 min., à temperatura ambiente (cerca de 24°C); passado este tempo, as linhas de precipitado eram, de um modo geral, perfeitamente visíveis, contra fundo escuro e sob iluminação tangencial, não tendo sido necessário fazer sua coloração.

RESULTADOS

Na Tabela apresentam-se os resultados obtidos com as 162 amostras de fezes, segundo a idade das crianças estudadas. Pode observar-se um acentuado aumento das percentagens de positividade a partir da classe de 6 a 8 meses, elevação esta que se mantém nas classes subsequentes.

DISCUSSÃO

A visualização de rotavírus por microscopia eletrônica é um método de elevada eficiência e rapidez, mas exige, obviamente, uma aparelhagem de custo elevado, além do que apresenta limitações de ordem operacional, quando o número de exames diários é superior a duas dezenas, situação de ocorrência frequente^{7,16,19,24,26,27}.

* "Securline" — Precision Dynamics Corporation
3031 Thornton Av., Burbank, Calif 91504

TABELA

Resultado da contraimunoeletroforese na identificação de rotavírus em extratos de fezes de crianças com quadros diarréicos agudos.

Idade (meses)	Nº Casos Estudados	Casos Positivos	
		Nº	%
≤ 1	52	5	9,6
2 — 4	48	3	6,2
4 — 6	30	3	10,0
6 — 8	11	8	72,7
8 — 10	9	7	77,7
10 — 12	12	8	66,6
Total	162	34	20,9

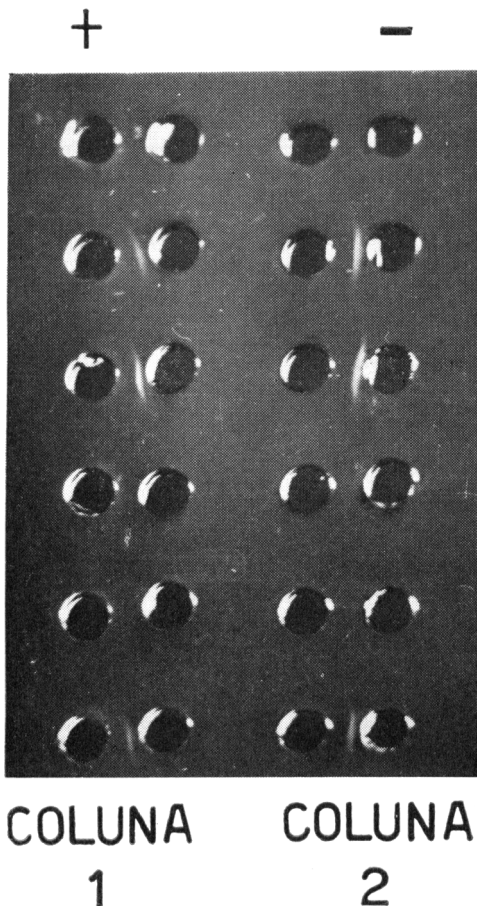


Figura — Identificação de rotavírus em 6 extratos fecais utilizando soro anti-rotavírus obtido por imunização de cobaias (coluna 1) e uma mistura de soros de bovinos adultos (coluna 2)

A possibilidade de identificação de rotavírus através da reação de fixação do complemento não deve ser considerada como promissora dado que os extratos fecais são, freqüentemente, anticomplementares²². A contraimunoeletroforese apresenta-se como um método qualitativo de grande simplicidade e rapidez, capaz de detectar pequenas quantidades de antígenos com mobilidade eletroforética relativamente rápida. Este método tem sido utilizado com bons resultados para a identificação de diversos antígenos virais^{3,17,18,20}. No caso dos rotavírus a contraimunoeletroforese mostrou ser um método rápido e econômico, dando resultados comparáveis aos da microscopia eletrônica e podendo identificar partículas virais incompletas^{26,35}. Nossos resultados confirmam a utilidade do referido método e, quando analisados em termos das percentagens de positividade obtidas, conforme a Tabela, assemelham-se aos obtidos por outros autores^{10,11,35}.

A Figura ilustra a identificação contraimunoeletroforética de rotavírus em 6 extratos fecais, testados em duplicata, contra o soro anti-rotavírus preparado em cobaia e contra uma mistura de soros de bovinos adultos, que em testes prévios de difusão em gel de agar, frente à cêpa "Compton-England", tinham dado uma precipitação específica. A interpretação dos resultados é inequívoca e em nenhum dos testes feitos, quando se usou esta mistura, se obtiveram reações não específicas. Estes resultados

sugerem, assim, a possibilidade de se usar, como soro específico identificador do antígeno do grupo rotavírus, uma mistura de soros de bovinos adultos, onde é comum o encontro de anticorpos que reagem com aquele antígeno. Em relação à técnica de imunofluorescência, Flewett sugere que se use aquela mistura de soros de bovinos adultos, desde que respeitadas determinadas normas: Woode e col.³⁹ demonstraram, pelas provas de difusão em gel de agar, a presença de um antígeno de grupo comum aos rotavírus humanos e bovinos. Rodger e col.³⁰ consideram que as diferenças existentes nas proteínas da camada externa da

cápside de rotavírus humanos e rotavírus bovinos devem ser mínimas. Por outro lado, tanto um como outro grupo de vírus não reagem com soros anti-reovírus dos tipos 1, 2 e 3, nem com os soros anti-orbivírus^{15,27}. Resta a consideração dos coronavírus humanos como capazes de ocasionarem quadros de gastroenterite, tal como ocorre com porcos e bovinos, onde os coronavírus são importante causa de enterite. Esta consideração é meramente especulativa, além de que os coronavírus de bovinos não estão sorologicamente relacionados com os coronavírus humanos³¹.

RSPUBB9/398

CANDEIAS, J. A. N. [Detection of rotavirus by counterimmunoelectrophoresis in cases of infantile diarrhea.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:99-103, 1978.

ABSTRACT: The faecal samples of 162 children with acute diarrhea were tested by counterimmunoelectrophoresis in order to detect rotaviruses. In 72.7%, 77.7% and 66.6% of samples from children of different age groups, varying from 6 to 8 months to 1 year or older, a positive result was found.

UNITERMS: Rotavirus. (Orbivirus) Immunoelectrophoresis. Diarrhea, infantile.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, W. R. & KRAFT, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141: 359-60, 1963.
2. BANATVALA, J. E. et al. In vitro detection of human rotaviruses. *Lancet*, 2:821, 1975.
3. BELIN, B. S. & PIROJBOOT, N. A rapid method for demonstration of precipitating antibody against influenza virus by counterimmunoelectrophoresis. *J. infect. Dis.*, 126:345-7, 1972.
4. BIRCH, C. J. et al. A study of the prevalence of rotavirus infection in children with gastroenteritis admitted to an infectious diseases hospital. *J. med. Virol.*, 1:69-77, 1977.
5. BISHOP, R. F. et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, 1:149-51, 1974.
6. BISHOP, R. F. et al. Evidence for viral gastroenteritis. *New Engl. J. Med.* 289:1096-7, 1973.
7. BISHOP, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-3, 1973.
8. BORTOLUSSI, R. et al. Studies on the etiology of acute infantile diarrhea. *Pediat. Res.* 8:379, 1974.
9. BRYDEN, A. S. et al. A rabbit rotavirus. *Vet. Rec.*, 99:323, 1976.
10. BRYDEN, A. S. et al. Rotavirus enteritis in the West Midlands during, 1974. *Lancet*, 1:241-3, 1975.

* Flewett, T. H. Informação pessoal

11. CARR, M. E. et al. The clinical features of infantile gastroenteritis due to rotavirus. *Scand. J. infect. Dis.*, 8: 241-3, 1976.
12. CRUICKSHANK, J. et al. Viruses in gastroenteritis. *Lancet*, 1:1353, 1974.
13. DAVIDSON, G. P. et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, 1:242-5, 1975.
14. FLEWETT, T. H. et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, 2:61-3, 1974.
15. FLEWETT, T. H. et al. Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Rec.*, 96:477, 1975.
16. FLEWETT, T. H. et al. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2:1497, 1973.
17. FORTUNATO, J. et al. Rapid detection of antibodies to cytomegalovirus by counterimmunoelctrophoresis. *J. infect. Dis.*, 135:432-7, 1977.
18. GOCKE, D. J. & HOWE, C. Rapid detection of Australia antigen by counterimmunoelctrophoresis. *J. Immunol.*, 104: 1031-2, 1970.
19. GOMEZ-BARRETO, J. et al. Acute enteritis associated with reovirus-like agents. *J. Amer. med. Ass.*, 235:1857-60, 1976.
20. HIERHOLZER, J. C. & BARME, M. Counterimmunoelctrophoresis with adenovirus type-specific antihemagglutin sera as a rapid diagnostic method. *J. Immunol.*, 112:987-95, 1974.
21. KAPIKIAN, A. Z. et al. New complement — fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*, 1:1056-60, 1975.
22. KAPIKIAN, A. Z. et al. Reoviruslike agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*, 185:1049-53, 1974.
23. KAPIKIAN, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10:1075-81, 1972.
24. MADELEY, C. R. et al. Stool viruses in babies in Glasgow. *J. Hyg., Cambridge*, 78:261-73, 1977.
25. MEBUS, C. A. et al. Calf diarrhoea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. *Nebr. Agric. Exp. Stat. Res. Bull.*, (233):1-16, 1969.
26. MIDDLETON, P. J. et al. Counter-immunoelctrophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbivirus) antigen and antibody. *J. clin. Pathol.*, 29:191-7, 1976.
27. MIDDLETON, P. J. et al. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet*, 1: 1241-4, 1974.
28. MUCH, D. H. & ZAJAC, I. Purification and characterization of epizootic diarrhoea of infant mice virus. *Infect. Immun.*, 6:1019-24, 1972.
29. ORSTAVIK, I. & HAUG, K. W. Virus-specific IgM antibodies in acute gastroenteritis due to a reovirus-like agent (Rotavirus). *Scand. J. infect. Dis.*, 8:237-40, 1976.
30. RODGER, S. M. et al. Biochemical and biophysical characteristics of diarrhoea virus of human and calf origin. *J. Virol.*, 16:1229-35, 1975.
31. ROTAVIRUS of man and animals. *Lancet*, 1:257-9, 1975.
32. SNODGRASS, D. R. et al. A rotavirus in lambs with diarrhoea. *Res. Vet. Sci.*, 20:113-4, 1976.
33. TANG, G. S. et al. Virus in faecal extracts from children with gastroenteritis. *Lancet*, 1:1109, 1974.
34. THOULESS, M. E. et al. Serological relationship between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.*, 53:287-94, 1977.
35. TUFVESSON, B. & JOHNSON, T. Immunoelectroosmophoresis for detection of reo-like virus: methodology and comparison with electron microscopy. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 84: 225-8, 1976.
36. TYRRELL, D. A. J. et al. Coronaviridae. *Intervirology*, 5:76-82, 1975.
37. WOODE, G. N. et al. The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum-deprived calves in Great Britain. *Res. Vet. Sci.*, 16: 102-5, 1974.
38. WOODE, G. N. et al. The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis of piglets. *J. med. Microbiol.*, 9:203-9, 1976.
39. WOODE, G. N. et al. Morphological and antigenic relationships between viruses (Rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun.*, 14:804-10, 1976.

Recebido para publicação em 10/08/77

Aprovado para publicação em 17/08/77