

Vivian Terezinha Torrecilha Gonçalves

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX E ELISA
PARA DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NA CIDADE
DE CURITIBA**

**Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas para obtenção do grau de Bacharel.
Departamento de Patologia Básica, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.**

Orientadora : Prof^ª Dra Ida Cristina Gubert

Co- Orientadora: Prof^ª Meri Bordignon Nogueira

Curitiba

Dezembro - 2000

DEDICATÓRIA

Ofereço este trabalho à minha mãe Tereza, que unicamente pelos seus esforços e sacrifícios tornou possível este dia.

RESUMO

O rotavírus é um vírus RNA, de estrutura icosaédrica, com 65 a 70 nm de diâmetro, pertencente à família Reoviridae e possui um genoma segmentado em 11 filamentos. O rotavírus é o mais importante agente etiológico das gastroenterites que acometem crianças em todo o mundo. O vírus infecta o intestino delgado e a transmissão ocorre por via fecal-oral.

O objetivo deste estudo foi comparar os métodos de Aglutinação em Látex (AL) e Ensaio Imunoenzimático para detecção de Rotavírus e Adenovírus (EIARA), comumente utilizados para o diagnóstico de rotavírus, e analisar a epidemiologia das infecções por rotavírus na cidade de Curitiba.

Foram coletadas 428 amostras fecais no período de janeiro a outubro, as quais foram submetidas ao teste AL, e tiveram os dados demográficos anotados em prontuário. Foram analisadas 285 amostras pelos métodos AL e EIARA. Os resultados obtidos pela AL foram: 44 amostras positivas, 214 amostras negativas e 27 amostras indeterminadas. Considerando o EIARA como padrão ouro, o teste de AL mostrou sensibilidade e especificidade de 96%, valor preditivo positivo de 85% e valor preditivo negativo de 99%. Dos resultados indeterminados para AL, 63% das amostras foram reagentes para EIARA. A infecção por rotavírus foi mais freqüente nos meses de maio, junho e agosto, que apresentaram temperatura baixa, umidade relativa do ar e índice pluviométrico também muito baixos. A infecção atinge crianças menores de 5 anos de idade e igualmente ambos os sexos.

Este estudo demonstrou que o rotavírus tem uma importante prevalência na cidade de Curitiba principalmente no período de maio a agosto. Os resultados indicaram que a AL apresenta sensibilidade e especificidade altas, porém as amostras indeterminadas devem ser submetidas a um teste confirmatório.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Classificação.....	2
1.3 Morfologia.....	2
1.4 Patogenia.....	3
1.5 Resposta Imune.....	3
1.6 Epidemiologia.....	4
1.7 Transmissão.....	4
1.8 Diagnóstico.....	5
1.8.1 Aglutinação em Látex.....	5
1.8.2 EIARA.....	6
1.9 Tratamento.....	6
1.10 Profilaxia.....	6
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4.1 Casuística.....	9
4.2 Métodos.....	9
4.2.1 Processamento das Amostras.....	9
4.2.1.1 Processamento 1- Aglutinação em Látex.....	9
4.2.1.2 Processamento 2 – EIARA.....	9
4.2.2 Método de Aglutinação.....	10
4.2.3 Método EIARA.....	10
4.2.3.1 Procedimento do teste.....	10
4.2.4 Cálculo do Cut off.....	12
4.3 Preparo de Soluções.....	13
5. RESULTADOS.....	14

6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO.....	22
8. BIBLIOGRAFIA.....	23

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Rotavirus é o mais importante agente etiológico das gastroenterites que acometem crianças e recém-nascidos no mundo todo (STALS *et al*, 1984).

Nas duas décadas passadas, causas virais de gastroenterites foram descobertas, e as viroses foram, juntamente com as bactérias e parasitas, envolvidas como um importante patógeno da gastroenterite (BLACKLOW & GREENBERG, 1991).

O vírus foi descrito pela primeira vez em 1973 por Bishop *et al* quando analisavam biópsia de mucosa duodenal de 9 crianças com gastroenterites não bacterianas. Os autores observaram, através de microscopia eletrônica, partículas virais em células epiteliais de seis pacientes que apresentavam morfologia idêntica (BISHOP, 1973).

Em 1973, Flewett *et al* observaram em amostras fecais de pacientes com gastroenterites, através de microscopia eletrônica, que 19,84% das amostras continham partículas virais parecidas com os reovirus, mais ou menos na mesma época dos trabalhos de Bishop (FLEWETT, BRYDEN & DAVIES, 1973). Desde a descoberta do vírus Norwalk em 1972, foram descritas cinco categorias importantes de gastroenterites virais que acometem humanos: rotavirus, adenovirus entérico, vírus Norwalk, calicivirus e astrovirus.

O rotavirus é conhecido como o agente mais comum da diarréia severa infantil, causando 3,5 bilhões de casos de infecção por ano nos Estados Unidos (OMS), resultando em 35% de hospitalizações por gastroenterites e 75 das 150 mortes em um estudo realizado em vários hospitais (HO, 1988).

No Brasil, os primeiros casos de gastroenterite por rotavirus foram descritos por Linhares *et al* em 1977, que detectaram a presença do vírus em amostras diarréicas de crianças em Belém do Pará e em uma população indígena da região. Desde então, passou-se a observar a presença do vírus em outras regiões do país (GUIMARÃES, 1994).

1.2 CLASSIFICAÇÃO

Rotavirus está classificado como um membro da família Reoviridae (MATTHEWS, 1978), que possui oito gêneros distintos: Orthoreovirus, Rotavirus, Orbivirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cypovirus, Oryzavirus, Phytoreovirus, e Fijivirus; O gênero Rotavirus possui cinco espécies: Rotavirus A, que infecta pássaros e mamíferos, Rotavirus B, que infecta mamíferos, Rotavirus C, que infecta homens e suínos, Rotavirus D, infecta aves e o Rotavirus E que infecta suínos. (VAN REGENMORTEL, 2000). Os membros da família Reoviridae se caracterizam por serem vírus de simetria icosaédrica, sem envoltório, medindo de 60 a 80 nm e apresentam RNA de cadeia dupla (CARBALLAL, 1991).

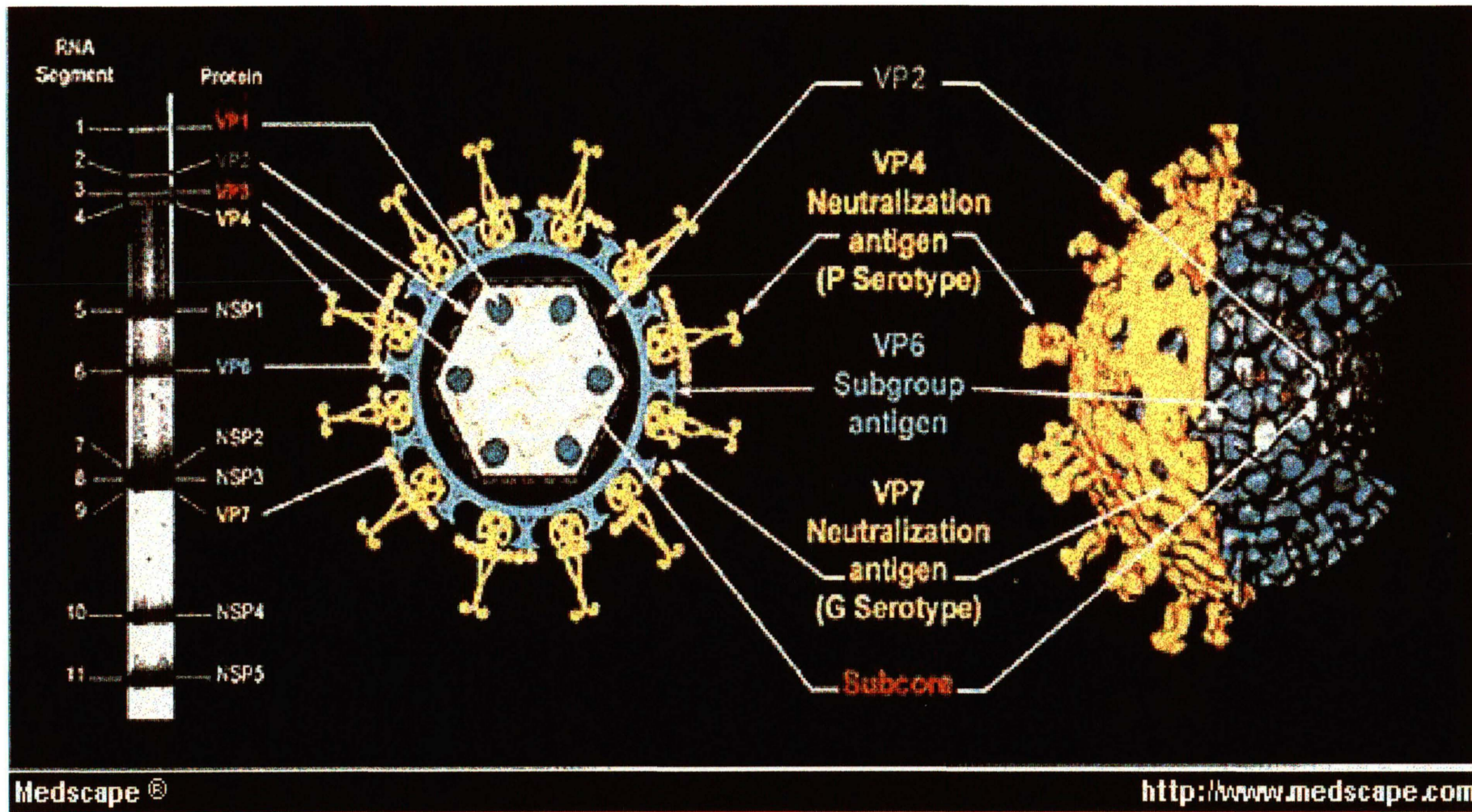
Sorologicamente, se dividem em três grupos antigênicos por reação de neutralização e inibição de hemaglutinação, e todos compartilham um antígeno comum de fixação do complemento (CARBALLAL, 1991). O Rotavirus pode ser diferenciado dos demais vírus da família por sua capacidade de fixar complemento e por microscopia eletrônica (IEM). (KAPIKIAN & CHANOCK, 1990)

1.3 MORFOLOGIA

A denominação rotavirus é originária da palavra latina Rota, que significa roda, em função de sua forma circular. O Rotavirus mede aproximadamente 70 nm de diâmetro e possui um capsídeo protéico, icosaédrico e duplo. O capsídeo interno contém onze segmentos RNA de dupla cadeia, que são classificados em quatro classes por ordem de tamanho conforme demonstrado pelo método de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (LENNETE, 1995), e também proteínas com antígeno comum de grupo - VP6. O capsídeo externo, contém os determinantes antigênicos específicos VP7 e VP4 (GUIMARÃES, 1994). As demais proteínas que compõem o rotavirus estão ilustradas na figura 1.

O desenvolvimento de técnicas para cultivo de rotavirus em cultura celular possibilitou a identificação dos subgrupos e sorotipos virais (SATO *et al*, 1981). O gênero Rotavirus é constituído pelos sorotipos A, B, C, D, E que são diferenciados por um antígeno que está presente na proteína VP6. Todas as cepas que possuem esse

Figura 1 - ESTRUTURA DIAGRAMÁTICA DO ROTAVÍRUS



Correspondência entre os segmentos genômicos do rotavírus e as proteínas virais e suas localizações na partícula viral - segundo CONNER, MATSON, ESTES, 1994

determinante antigênico se enquadram no grupo A; e as cepas que não o possuem são chamadas atípicas e estão nos grupos B, C, D, e E (GÓMEZ & GRINSTEIN, 1991).

1.4 PATOGENIA

Os vírus infectam as células do intestino delgado responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, resultando em diminuição da absorção de água e de sais, com conseqüente diarreia líquida e desidratação. A diarreia ocorre pelo aumento da pressão osmótica no intestino e a acidose metabólica ocorre pela fermentação bacteriana desses carboidratos. (GASTROENTERITES VIRAIS)

Bishop *et al* observaram em seu trabalho que muitas crianças mostraram anormalidades na mucosa duodenal associadas com uma depressão na atividade da enzima dissacaridase. Adultos e crianças apresentaram dano nas mucosas retal e gástrica durante a doença. Durante a convalescença, o nível de atividade da dissacaridase e o tecido duodenal retornaram rapidamente ao normal (BISHOP, 1973).

Nas infecções por Rotavirus, estudos de biópsias revelaram que há encurtamento e atrofia nas vilosidades intestinais, alargamento das células reticulares, infiltração de linfócitos nas vilosidades da lâmina própria e microvilosidades irregulares. O maior mecanismo da indução de diarreia por Rotavirus parece ser um decréscimo da absorção de sais e água relacionado a uma infecção seletiva das células absorptivas das vilosidades intestinais resultando em uma secreção bastante fluida (LENNETE, 1995).

1.5 RESPOSTA IMUNE

A proteção imunológica contra a infecção por rotavirus é mediada por mecanismos que previnem a invasão de enterocistos suscetíveis, a fim de limitar a disseminação da infecção.

Estudos com imunização passiva em animais demonstraram que a imunização sorológica apenas é insuficiente, e a imunização no intestino é necessária (CONNER & RAMIG, 1997). Os anticorpos intestinais, principalmente IgA, têm sido apontados

como os de maior importância para proteção, sendo encontrados em amostras fecais durante todo o período clínico da infecção (STALS *et al*, 1984). Respostas epítipo – específicas para a VP7 e VP4 também parecem estar correlacionadas com a imunidade contra a infecção (CONNER & RAMIG, 1997).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A maior incidência de infecções por Rotavirus ocorre em crianças menores de dois anos de idade (SINGH-NAZ, RODRIGUEZ & PEDREIRA, 1990), sendo que o pico de incidência da doença ocorre de três a quinze meses de vida, mas com uma mortalidade considerável até o segundo ano. Durante os dois ou três primeiros meses de idade, a criança é relativamente imune à doença, pois acredita-se que o anticorpo materno seja transferido através da placenta ao feto (BLACKLOW & GREENBERG, 1991).

O rotavirus tem uma considerável sazonalidade que influencia fortemente no número de infecções anuais, sendo que o pico de ocorrência dos casos se dá no inverno e o mínimo se dá no verão (KELKAR *et al*, 1999). O número de hospitalizações também aumenta nos meses de inverno e diminui consideravelmente no verão (HO *et al*, 1988).

O rotavirus do tipo A é responsável pela maioria dos casos de surtos de gastroenterites por rotavirus; no entanto, os vírus do grupo B e C também são capazes de infectar humanos (GUIMARÃES, 1994). Casos de infecções por rotavirus do grupo C foram observados em adultos em São Paulo (SOUZA, 1998), e em pequenos surtos no Japão, Finlândia e Inglaterra (GUIMARÃES, 1994). Os vírus dos grupos D e E infectam aves e suínos respectivamente.

1.7 TRANSMISSÃO

O rotavirus é transmitido por via fecal-oral. A administração oral de um material fecal rotavirus-positivo leva à aquisição da doença (KAPIKIAN *et al*, 1983). A origem da infecção por rotavirus em crianças saudáveis que não entraram em contato com outras crianças com gastroenterite não é bem documentada (KAPIKIAN & CHANOCK,

1990), porém, há uma provável possibilidade de um irmão mais velho ou os próprios pais com infecção subclínica transmitirem a doença para a criança (ENGLEBERG *et al*, 1982).

A resistência do vírus ao ressecamento facilita a transmissão através da água, de objetos contaminados e das mãos. Ao ser ingerido, o rotavírus vai até o estômago onde resiste à degradação pelo pH ácido e sais biliares. Não há evidência da transmissão de rotavirus animal para os humanos ou vice-versa em condições naturais, mesmo porque os genes de rotavirus humano diferem dos genes dos rotavirus que acometem os outros animais (KAPIKIAN & CHANOCK, 1990).

1.8 DIAGNÓSTICO

Devido à grande quantidade de partículas virais presentes nas fezes, todos os métodos diagnósticos compreendem o reconhecimento dos sintomas clínicos ou a detecção de antígenos ou componentes virais nas fezes. Atualmente, os métodos mais utilizados em todo o mundo são os que detectam antígenos virais como a Aglutinação em Látex e Ensaio Imunoenzimático; diferentemente da ME e cultivo celular, ambos são métodos rápidos mas também muito sensíveis, sendo ideais para o diagnóstico clínico.

Estas técnicas se baseiam em uma reação antígeno-anticorpo e detectam o principal componente antigênico dos rotavirus do sorotipo A localizado na proteína VP6 (GÓMEZ & GRINSTEIN, 1991). Há também outros métodos utilizados principalmente na pesquisa científica que visam a pesquisa da partícula viral - microscopia eletrônica e cultura celular - e do genoma viral, como eletroforese em gel de poliacrilamida e PCR.

1.8.1 Aglutinação em Látex

O teste de aglutinação em látex para detecção de Rotavírus nas fezes consiste na detecção de antígenos de Rotavírus presentes em suspensão de material fecal, empregando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos para este agente.

1.8.2 EIARA - Ensaio Imunoenzimático para Detecção Antígenos de Rotavírus e Adenovírus

Este teste consiste na detecção de antígenos de rotavírus e de adenovírus presentes nas fezes pelo método imunoenzimático.

O ensaio consiste no método de "Sandwich" duplo, em que os antígenos são capturados em fase sólida por soros hiperimunes de cabras e a detecção dos antígenos é evidenciada por soros hiperimunes de cobaias. Em seguida, adiciona-se um conjugado anti-Ig de cobaia marcado com a enzima peroxidase. Para revelação, adiciona-se tetrametilbenzidina (TMB) que, sob a ação da peroxidase, dá origem a um composto de coloração azul turquesa que se torna amarelo após adição de ácido sulfúrico. A reação é lida em aparelho fotométrico em comprimento de onda de 450 nm.

Os sintomas clínicos comumente relatados são vômito, diarreia aquosa e febre. O período de incubação é de aproximadamente 24h e a duração da enfermidade é de 5 a 8 dias. Em alguns casos foram observadas associações entre gastroenterite rotaviral e sintomas no trato respiratório, porém estas observações não foram comprovadas em outros estudos (BLACKLOW & GREENBERG, 1991).

1.9 TRATAMENTO

Para pessoas com o sistema imune em boas condições, a infecção por rotavirus é auto-limitada, tendendo a desaparecer os sintomas em poucos dias. O tratamento é inespecífico e consiste em reposição oral, ou intravenosa em alguns casos, de soro contendo sais e glicose para reequilibrar o organismo e prevenir a desidratação (BLACKLOW & GREENBERG, 1991).

1.10 PROFILAXIA

Levando-se em consideração a alta taxa de mortalidade que representa a diarreia aguda na população, tendo o rotavirus como principal agente etiológico, podemos afirmar que as gastroenterites em geral e as diarreias causadas por rotavirus devem ser priorizadas dentro de um programa de saúde.

Há uma gama de medidas simples possíveis de se tomar, que poderiam reduzir os casos de infecção por rotavirus, como: melhoria das condições sanitárias do meio ambiente, principalmente em países menos desenvolvidos; educação sanitária para toda a população; prevenção em hospitais mantendo-se uma desinfecção eficiente e administração de um tratamento de suporte que previna da desidratação durante a infecção.

A prevenção e o controle da infecção por rotavirus mediante a utilização de desinfetantes químicos têm sido amplamente estudados, e os desinfetantes capazes de inativar o rotavirus efetivamente são o ácido hidrocloreídrico, ácido paracético, álcool isopropílico, gluconato de clorexidina, glutaraldeído, cloramina T , hexaclorofeno , complexo iodo-povidona e um complexo de amônio quaternário (GÓMEZ & GRINSTEIN, 1991). A solução de hipoclorito de sódio, comumente usada para desinfecção, não se mostrou eficaz para inativação em concentrações até 3% (v/v) (GUIMARÃES, 1994).

Baseado no fato de que o anticorpo IgA é o principal responsável pela resposta imune contra o rotavirus, houve um encorajamento na produção de vacinas de administração oral, utilizando vírus vivo e atenuado (GUIMARÃES, 1994). As vacinas mais utilizadas são a RIT, derivada do rotavirus bovino e a RRV (Rhesus Rotavirus Virus) ; ambas apresentam um alto nível de imunização (SINGH-NAZ, RODRIGUEZ & PEDREIRA, 1990).

No entanto, em um estudo feito com a vacina RIT 4237 em uma população nativa americana, mostrou que esta não foi eficaz na imunização da população (SANTOSHAM, 1990). Em outro estudo realizado com a vacina RRV, demonstrou-se que a administração desta acarreta alguns efeitos colaterais , sendo suspensa sua administração para a população (RIEPENHOFF-TALTY, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

O Rotavirus é o agente etiológico mais freqüente das gastroenterites virais, sendo responsável pela desidratação em crianças menores de 2 anos de idade, o que o torna importante clinicamente. O diagnóstico preciso e rápido é essencial para o controle da desidratação; para tanto, a comparação entre as metodologias de Aglutinação em Partículas de Látex e EIARA, comumente utilizadas para detecção de antígenos do Rotavirus, é importante a fim de se comprovar a eficácia das duas metodologias bem como a relação custo benefício que ambas oferecem para os laboratórios de análises clínicas e à população.

3. OBJETIVOS

- 3.3. Observar a sazonalidade das infecções por Rotavírus na cidade de Curitiba.
- 3.2. Avaliar a incidência do Rotavirus em amostras de pacientes atendidos nos postos de coleta do Laboratório Frischmann Aisengart, na cidade de Curitiba.
- 3.1. Comparar as metodologias de Aglutinação em Partículas de Látex e EIARA para detecção de antígenos de Rotavírus em fezes, metodologias comumente utilizadas para o diagnóstico laboratorial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Foram analisadas 285 amostras de fezes para pesquisa de antígenos de Rotavírus entérico, no período de janeiro de 2000 a outubro de 2000 em pacientes atendidos nos postos de coleta do Laboratório Frischmann Aisengart.

O estudo foi realizado com amostras coletadas em frasco seco, sem conservante. O transporte foi efetuado em caixas de isopor contendo gelo reciclável para preservação dos antígenos virais.

Foram utilizados dois métodos diagnósticos para detecção de antígenos de Rotavírus : Ensaio Imunoenzimático para detecção de Antígenos de Rotavírus e Adenovírus Entérico (EIARA) e o método de Aglutinação em partículas de Látex. Os dados demográficos dos pacientes foram colhidos a partir dos resultados do exame de aglutinação em látex. Ao todo foram analisadas 428 amostras, com dados registrados em prontuário.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Processamento das Amostras

As amostras foram processadas de acordo com dois protocolos diferentes, sendo aqui referidos como processamento 1 e 2.

4.2.1.1 Processamento 1 – Aglutinação Partículas de Látex

As amostras foram diluídas de forma a se obter uma concentração de 10% em solução tampão diluente (ROTAGEM, Biokit, S.A., Espanha), posteriormente homogeneizadas em agitador tipo Vortex e incubadas por 10 minutos a 25 (+-2)°C. Em seguida realizou-se centrifugação a 2000 rpm por dez minutos a temperatura de 25 (+-2)°C. O teste foi realizado com o sobrenadante e o sedimento foi desprezado.

4.2.1.2 Processamento 2 – EIARA

As amostras foram diluídas para uma concentração de 10% em solução tampão diluente (PBS – solução salina tamponada, pH 7.4), posteriormente homogeneizadas

em agitador tipo Vortex . Em seguida realizou-se centrifugação a 2000 rpm por dez minutos à temperatura de 25(+2)°C. O teste foi feito com o sobrenadante e o sedimento desprezado.

Quando não utilizado imediatamente, o sobrenadante foi armazenado a -20°C para utilização posterior.

4.2.2 Método de Aglutinação em Látex

Neste trabalho, utilizou-se o reagente ROTAGEN (Biokit, S.A., Espanha), e kits de vários lotes da marca Biokit.

Para a realização do teste, colocou-se 50 µl do sobrenadante da amostra em uma secção da lâmina e 50 µl na outra secção, tomando-se o cuidado de se identificar o controle e o teste.

Adicionou-se uma gota de látex controle na primeira secção e uma gota de reativo de látex na outra secção. Misturou-se e homogeneizou-se ambas as gotas com as amostras, utilizando pequenos bastões, um para cada secção.

Agitou-se a lâmina manualmente com movimentos circulares por 2 minutos, após este tempo, observou-se a ausência ou presença de aglutinação.

Considerou-se como reação positiva a aglutinação no reativo de látex com a amostra mais forte que o controle do látex. Quando o controle do látex também aglutinou, a reação foi considerada como inespecífica.

4.2.3 Método EIARA

Este teste consiste na detecção de antígenos de Rotavírus e de Adenovírus presentes nas fezes pelo método imunoenzimático.

4.2.3.1 Procedimento do teste

Para realizar a sensibilização da placa, diluiu-se 60µL do anticorpo de captura para rotavírus em 6mL do respectivo diluente e 60µL do anticorpo de captura para adenovírus em 6mL de diluente de anticorpo de captura. Homogeneizou-se bem e distribuiu-se 100µ L da solução do rotavírus em cada cavidade das fileiras ímpares e

do adenovírus nas fileiras pares da placa. A placa foi selada com folha adesiva e incubada a 4 ° C por 16 horas. Descolada a folha adesiva, a placa foi lavada com 200uL de tampão de lavagem com intervalos de 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

No ensaio enzimático, o controle positivo para rotavírus, adenovírus e as amostras foram testados nas diluições 1:4 e 1:12. Para isto, foi necessário distribuir 75µL do diluente de amostras e controles em cada cavidade da linhas A,C,E e G e 50µL nas linhas B, D,F e H. Adicionou-se 25µL da amostra a ser testada nas cavidades 1A e 2 A da placa, homogeneizou-se bem e transferiu-se 25µL da cavidade 1 A para 1B e da 2 A para a 2 B, restando assim 75µL da diluição 1:12 em 1 B e 2B. Os controles positivos foram diluídos da mesma forma. Quatro cavidades da tira tiveram que ser utilizadas para controle de substrato e controle de conjugado, portanto, foram colocados nestas apenas diluente de amostras em um volume final de 75µL.

Selada a placa com folha adesiva, esta foi incubada em banho-maria a 40°C por 30 minutos e lavada por três vezes como descrito acima.

Diluiu-se o soro detector 1:100 no respectivo diluente e distribuiu-se 100uL deste em todas as cavidades da placa. A placa foi selada com folha adesiva e incubada em banho-maria a 40°C (+/-2) por 30 minutos. Lavou-se a placa por três vezes.

Diluiu-se o conjugado 1:100 no respectivo diluente e distribuiu-se 100µL deste em todas as cavidades da placa, exceto nas duas cavidades de controles do substrato. A placa foi selada com folha adesiva e incubada em banho-maria a 40°C (+-2) por 30 minutos. A seguir, a placa foi lavada por três vezes.

Diluiu-se o substrato alguns minutos antes do uso, fazendo uma diluição 1:100 dos reagentes no respectivo diluente e foram distribuídos 100uL deste em todas as cavidades da placa, exceto nas 2 cavidades de controle de conjugado. A incubação foi realizada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 15 minutos. Bloqueou-se a reação adicionando-se 50µL de ácido sulfúrico 2M em todas as cavidades da placa. A reação foi lida em espectrofotômetro equipado com filtro de 450 nm.

4.2.4 Cálculo do Cut off

O valor do cut off representa o ponto médio para que uma amostra venha a ser considerada positiva ou negativa.

Foram consideradas reagentes para rotavirus as amostras que apresentaram coloração amarela nitidamente mais intensa e com densidade ótica 2 vezes mais alta que os controles de conjugado e substrato, na presença de anticorpo de captura para rotavirus.

Consideraram-se reagentes para adenovirus as amostras que apresentaram coloração amarela intensa e com densidade ótica 2 vezes mais alta do que os controles de conjugado e substrato, na presença de anticorpo de captura para adenovirus.

Foram consideradas não reagentes as amostras que não apresentaram coloração na presença de ambos anticorpos de captura.

As amostras que apresentaram coloração na presença de ambos anticorpos de captura tiveram de ser reexaminadas no teste confirmatório. As amostras indeterminadas por este exame, foram submetidas a um novo teste de ensaio imunoenzimático, utilizando como captura além de uma fileira de rotavirus, outra para adenovirus e também uma outra fileira sensibilizada com soro normal de cabra (SNC) diluído 1:100 em tampão próprio. Testou-se a amostra indeterminada nas diluições 1:4 e 1:12, com os reagentes nas diluições acima.

Foram consideradas reagentes as amostras que apresentarem densidade ótica significativamente mais altas, duas vezes a densidade ótica do SNC na presença de um dos capturas (infecção única) ou de ambos os capturas (infecção mista) quando comparados com a densidade ótica na presença de soro normal de cabra.

Amostras que na presença de soro normal de cabra e capturas apresentaram DO comparáveis foram consideradas inespecíficas.

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

4.3.1. Preparo do tampão PBS pH 7.4

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
H ₂ O destilada qsp	1000 ml

Acertar o pH adicionando HCl.

As outras soluções utilizadas foram as soluções dos kits que já vieram prontas.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 428 amostras fecais pelo método de aglutinação em látex; estes resultados permitiram analisar a sazonalidade e a incidência do rotavirus na população estudada.

A tabela 1 e o gráfico 1 mostram os resultados de aglutinação em látex durante o período que se inicia em janeiro de 2000 a outubro de 2000. Este gráfico representa a sazonalidade das infecções de rotavirus, que apresentam maior incidência em maio, junho e agosto.

O gráfico 2 mostra a relação entre os períodos de maior incidência das infecções por rotavirus e os índices pluviométricos, no período que compreende os meses de janeiro a setembro. Os meses de maior precipitação são os meses de janeiro, fevereiro e setembro, que alcançaram uma média de 171.1 mm³, 130.1 mm³ e 242.6 mm³ respectivamente; porém, nestes meses quase não surgiram casos positivos para rotavirus.

Quanto à umidade relativa do ar (gráfico 3), observou-se que os meses em que apareceram os maiores índices de infecção por rotavirus coincidiram com a menor média de umidade relativa.

O gráfico 4 mostra a proporção sexual em que ocorrem as gastroenterites na população estudada. Embora as gastroenterites aparentemente acometam mais crianças do sexo masculino, os dados obtidos com este estudo não apontam diferenças significativas entre ambos os sexos, ou seja, meninos e meninas podem ser igualmente vítimas da infecção por rotavirus.

Com relação à faixa etária (gráfico 5a e 5b), na população estudada o maior número de casos foi observado em crianças menores de cinco anos de idade (84%) com maior prevalência (62%) na faixa etária de doze a vinte e quatro meses, enquanto somente quatro crianças com até seis meses de idade apresentaram a infecção.

Duzentas e oitenta e cinco amostras de fezes foram analisadas pelos métodos de aglutinação em partículas de látex (AL) e ensaio imunoenzimático para rotavirus e adenovírus (EIARA).

O gráfico 6 demonstra que das 44 amostras reagentes para AL, todas (100%) apresentaram-se reagentes para rotavirus pelo método EIARA; das 214 amostras não-reagentes para AL, 207(96.73%) apresentaram-se não reagentes para rotavirus e adenovirus, 5 (2.34%) reagentes para adenovirus, e 2 (0.93%) reagentes para rotavirus pelo método EIARA; 27 amostras apresentaram resultado indeterminado para AL, e destas, 1(3.70 %) apresentou-se reagente para rotavirus e adenovirus, 17 (62.97%) reagente para rotavirus, 8 (29.63%) não reagente para ambos os vírus e 1 (3.70%) reagente para adenovirus.

→ Cálculo da Sensibilidade:

A sensibilidade do teste de aglutinação em látex foi calculada a partir de um comparação de seus resultados com os resultados do teste de EIARA . O valor encontrado para o teste de aglutinação em látex foi de 96%.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \cdot 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{52}{52+2} \cdot 100 = 96,0\%$$

→ Cálculo da Especificidade:

O cálculo da especificidade também foi realizado a partir da comparação dos resultados de AL frente aos de EIARA. O valor encontrado coincidentemente foi igual ao da sensibilidade.

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{d+b} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{212}{212+9} \cdot 100 = 96\%$$

→ Cálculo do Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo:

Os valores preditivos positivo e negativo foram calculados para o método de AL.

Nota-se que o valor preditivo negativo aproxima-se bastante de 100%.

$$\text{VPP} = \frac{a}{a+b} = \frac{52}{52+9} = 85\%$$

$$\text{VPN} = \frac{d}{c+d} = \frac{212}{212+2} = 99\%$$

→ Gráficos 2 e 3: * fonte SIMEPAR

Tabela 1 – Resultados de Aglutinação em Látex no período de janeiro de 2000 a outubro de 2000.

MESES	RESULTADOS		
	Reagente	Não Reagente	Indeterminado
janeiro	0	25	0
fevereiro	1	36	4
março	0	31	1
abril	3	34	2
maio	19	42	11
junho	21	44	3
julho	5	30	0
agosto	10	39	5
setembro	2	24	1
outubro	0	35	0

Gráfico 1 – Sazonalidade das Infecções por Rotavirus na cidade de Curitiba

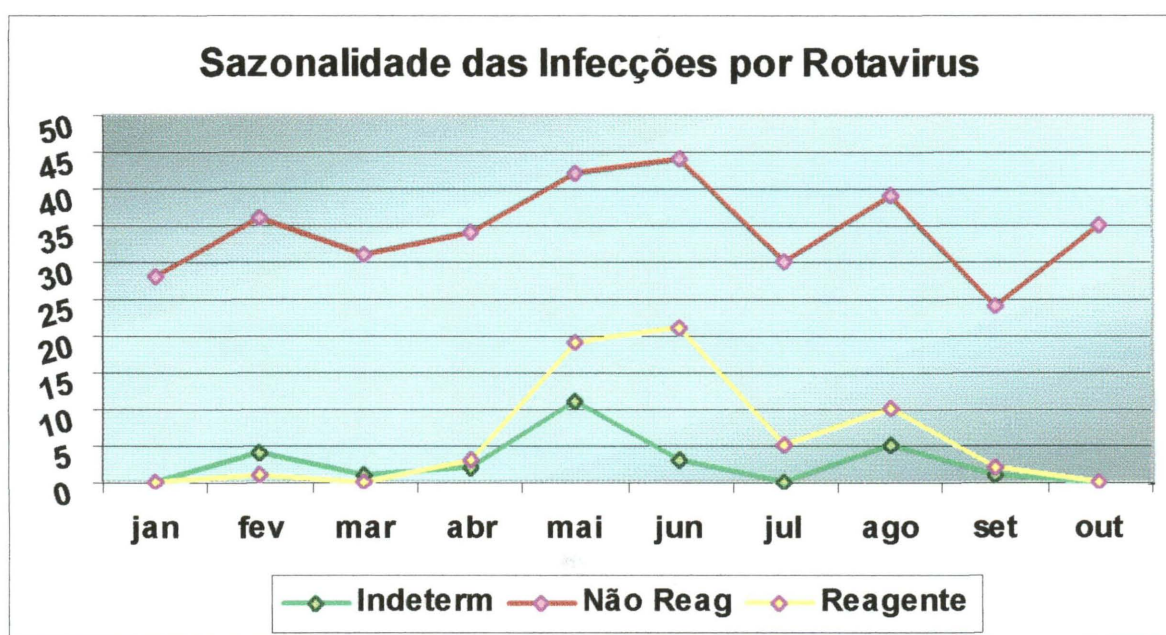


Gráfico 2 – Índices Pluvimétricos Relacionados às infecções por Rotavirus*

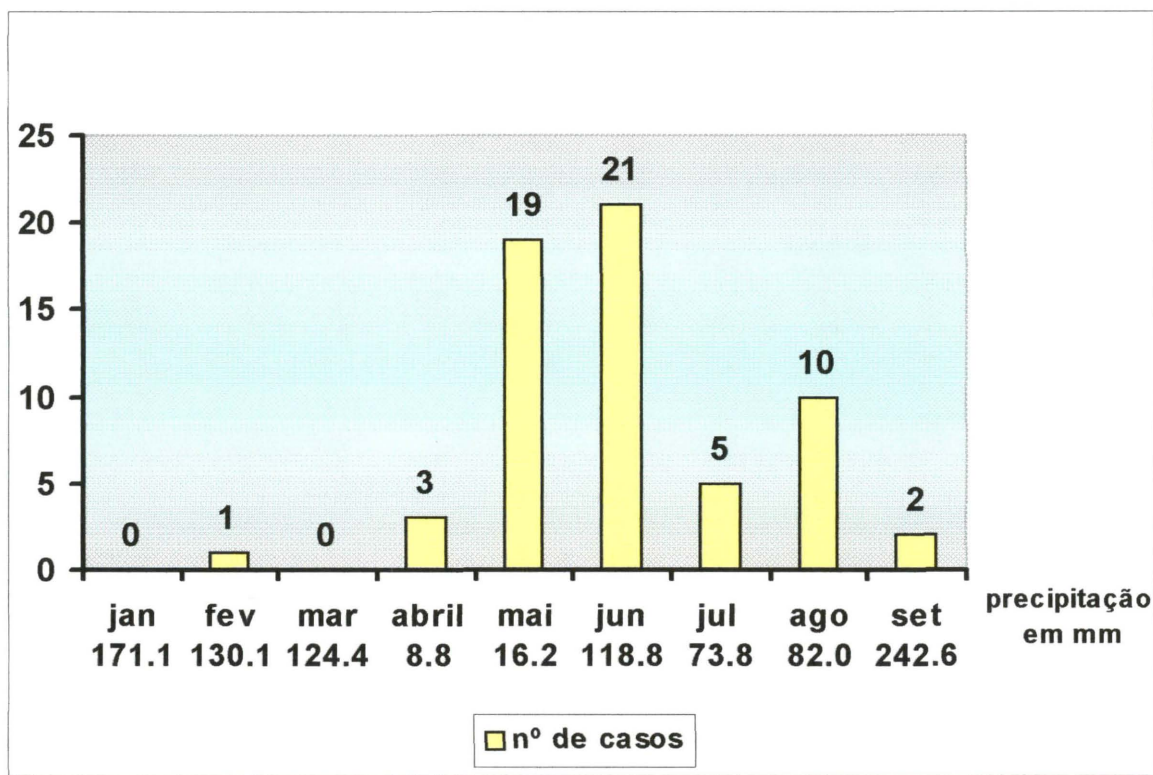


Gráfico 3 – Umidade Relativa do Ar Relacionada às infecções por Rotavirus*

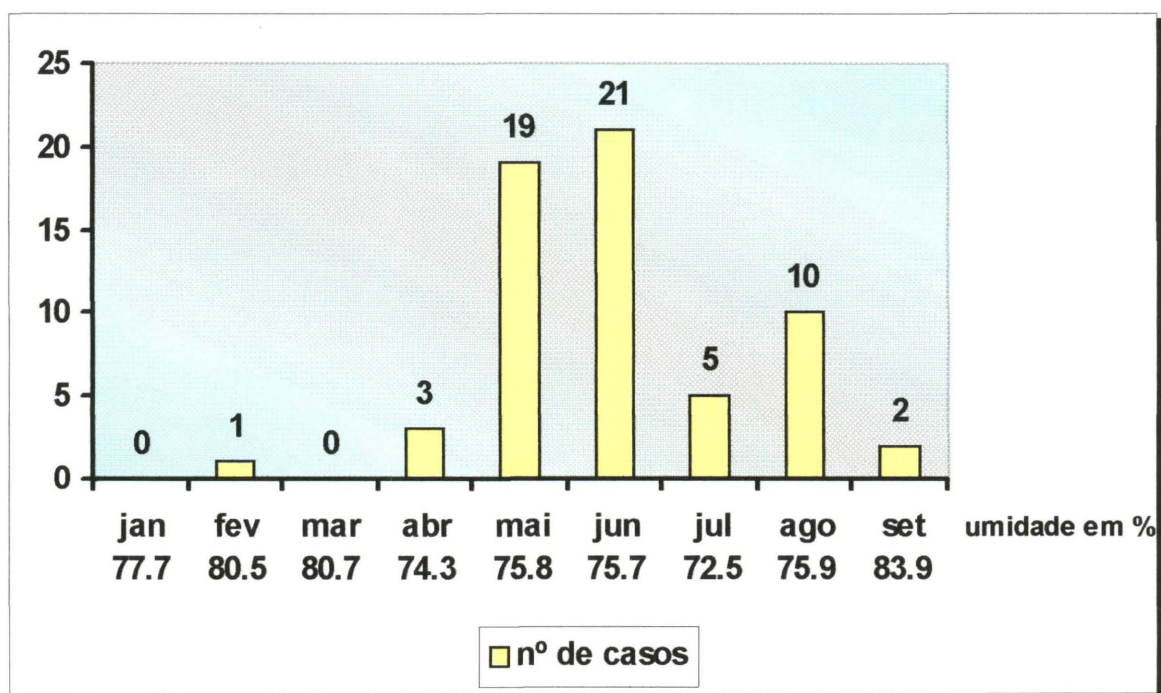


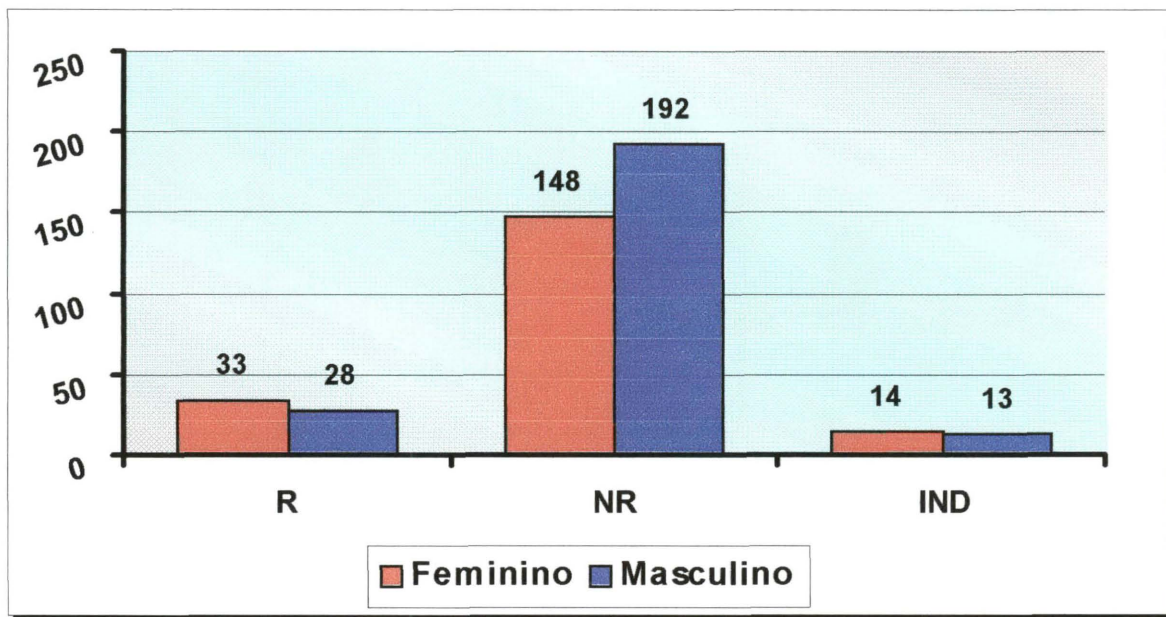
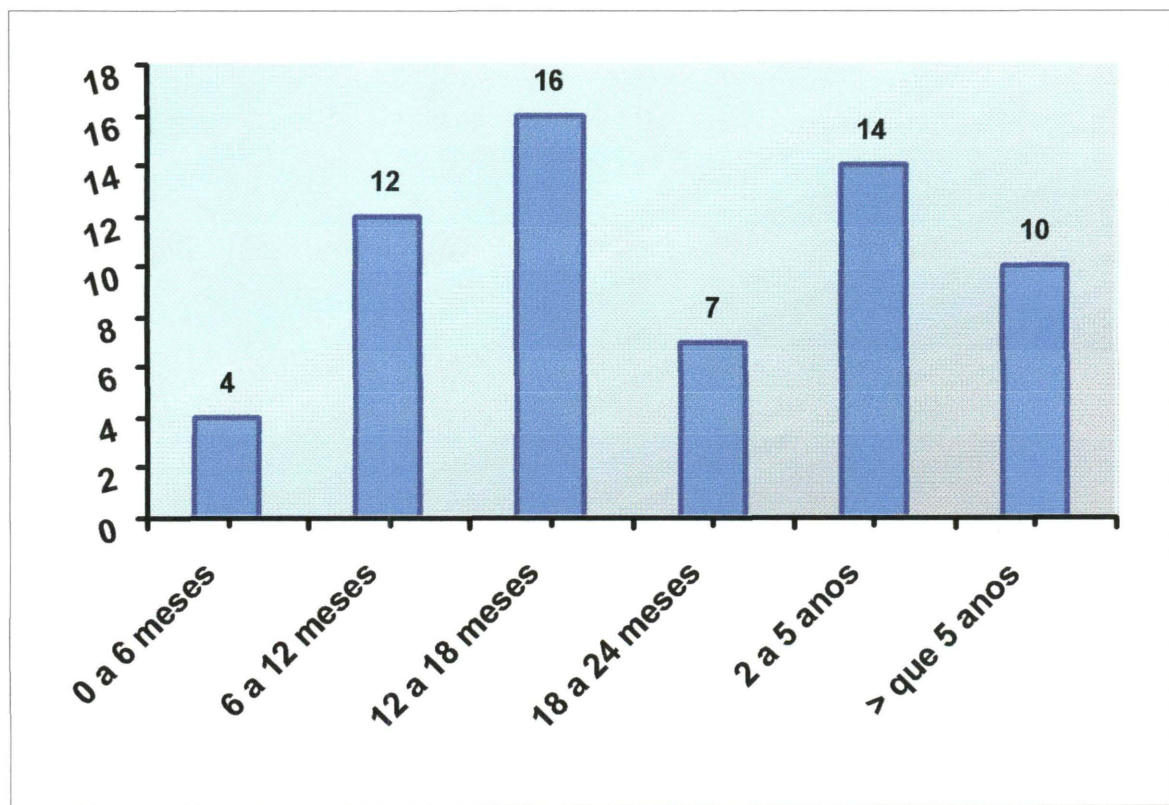
Gráfico 4 – Proporção Sexual em que ocorrem as Gastroenterites**Gráfico 5a – Infecção do Rotavírus por Faixa Etária na População Estudada**

Gráfico 5b – Índices de Infecção por Rotavirus na População Estudada

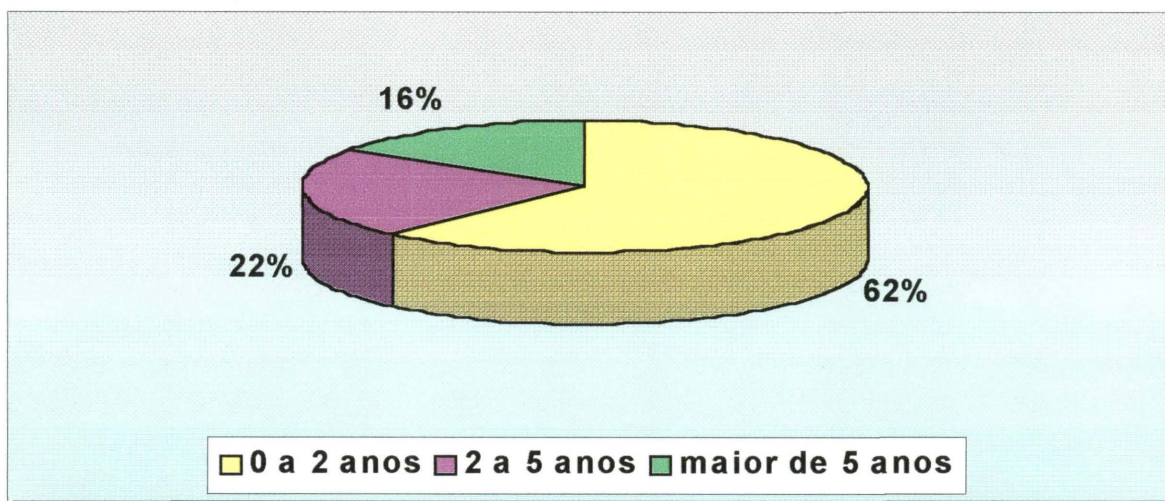
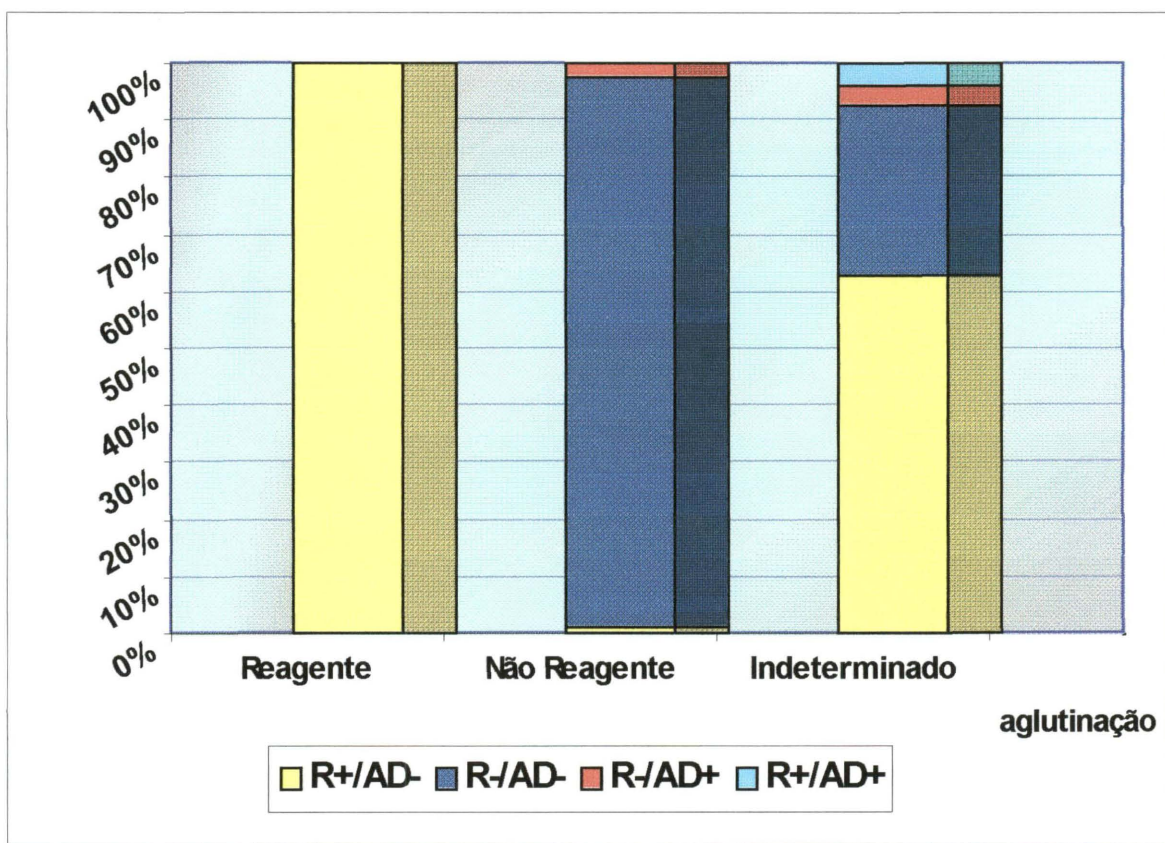


Gráfico 6 – Comparação entre os Métodos de Aglutinação em Látex e EIARA



7. DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados obtidos com este estudo, observou-se que a maior incidência da infecção por rotavirus se deu nos meses de maio, junho e agosto, que são os que apresentaram algumas das menores médias de temperatura do ano 2000. Este fato concorda com a literatura estudada, em que os relatos de maior incidência das infecções por rotavirus são observados nos meses de inverno, e o índice de infecções é bastante reduzido no verão. O fato de não se observar infecções por rotavirus no mês de julho pode ser explicado pelo fato de ser um mês que coincide com férias escolares, e as crianças não estão em contato com outras em creches, colégios etc.

Os picos de infecção por rotavirus foram observados em meses que apresentaram um índice pluviométrico relativamente baixo e umidade relativa do ar também muito baixa. Em estudos anteriores, a correlação entre a umidade relativa e outros padrões temporais com os surtos de infecção não foram observadas (KONNO et al, 1983).

Kelkar *et al* observaram que a infecção por rotavirus é predominante em crianças do sexo masculino e Ho *et al* observaram que a hospitalização de meninos é mais freqüente do que a de meninas. O gráfico 4 demonstra que tanto as infecções por rotavirus quanto o número de casos de gastroenterites na população são proporcionais para ambos os sexos.

Das pessoas infectadas por rotavirus, 84% dos casos atingem crianças menores de 5 anos, e destas, 55% têm de 6 a 24 meses. Champsaur *et al* observaram que das crianças infectadas, 32% eram neonatas, 29% tinham de um a seis meses de idade e 28% tinham de 7 a 24 meses, isto é, 89% dos infectados eram menores de 2 anos.

Ao se fazer a comparação entre os métodos de AL e EIARA, observou-se que 63% das amostras que apresentaram resultados indeterminados em AL eram de fato reagentes para o EIARA. Este resultado é importante por ser a aglutinação em látex um método bastante utilizado em diagnóstico laboratorial, e um resultado indeterminado precisa ser submetido a um teste confirmatório. Este procedimento deveria ser adotado por todos os laboratórios de análises clínicas que fazem a

pesquisa de antígeno para rotavirus, pois um caso de infecção deve ser tratado com o devido cuidado.

Para se testar a eficiência e confiabilidade do teste de AL da marca Biokit, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, e os valores encontrados foram de 96%, 96%, 85% e 99% respectivamente. Lipson et al testaram cinco marcas de kits diferentes para Aglutinação em Látex, e estes apresentaram uma sensibilidade de 85%, 89%, 95% e 91%, e a especificidade dos testes foi de 100%. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 85, 89, 95 e 91%.

O teste de Aglutinação em Látex mostrou-se muito sensível e específico, provando que este teste exclui bastante a probabilidade de um diagnóstico falso negativo e que raramente se tem um resultado positivo quando há ausência da doença, isto é, falso positivo. O valor preditivo positivo de um teste é a probabilidade de uma pessoa ter realmente a doença quando o teste dá um resultado positivo; isto é, quando um resultado se mostra positivo para AL, 85% dos casos realmente são de infecções por rotavirus. O valor preditivo negativo encontrado no teste de Aglutinação em Látex significa que 99% dos casos que apresentam resultado negativo realmente não apresentam a doença (FLETCHER et al, 1989).

8. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que a incidência do rotavirus é maior em crianças menores de 5 anos, e a sazonalidade da doença atinge os picos de infecção nos meses mais frios. A infecção por rotavirus atinge igualmente ambos os sexos e a gastroenterite também atinge crianças em igual proporção.

Das técnicas utilizadas em laboratório, a Aglutinação em Látex se mostrou muito eficaz frente ao método de EIARA, porém os resultados indeterminados precisam ser submetidos ao teste confirmatório.

5. BIBLIOGRAFIA

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B.N; KNIPE, D.M.; CHANOCK, R.M.; HIRSCH, M. S.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B. **Virology**. 2.ed. New York : Raven Press, 1990. p. 1353 – 1404.

GÓMEZ, J. A.; GRINSTEIN, S. Rotavirus. In: CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J.R. **Virologia Medica**. Buenos Aires: El Ateneu, 1991. p.227-236.

LENETTE, E.H; LENNETE, D.A ; LENNETE, E. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamidial Infections**. 7.ed. Washington: American Public Health Association, 1995.

MATTHEWS, R.E.F. The classification and nomenclature of viruses. Resumo de resultados da reunião do comitê internacional de taxonomia de virus em Hague, setembro, 1978. **Intervirology** ,Basel, v.11, p.133-135,1979.

SINGH-NAZ, N.; RODRIGUEZ, W. J.; PEDREIRA, F. Prospect of a rotavirus vaccine . **Pediatric Annals** ,Tharofare, v.19, p.727-731, 1990.

BLACKLOW, N.R.; GREENBERG, M.D. Viral Gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.325, p.252-264,1991.

BISHOP, R.F.; DAVIDSON G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **The Lancet**, Boston, v.2 , p.1281-1283, 1973.

KAPIKIAN A. Z.; WYATT R.G.; LEVINE M.M. et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.147, p. 95-106, 1983.

ENGLEBERG, N.C.; HOLBURT, E.N.; BARRETT, T.J. et al. Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: risk factors in the home environment. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.145, p. 894-898, 1982.

GUIMARÃES, M.A.A.M. Reoviridae, caliciviridae, astrovirus, agente de Norwalk e outras viroses do trato gastrointestinal. In: OLIVEIRA, L.H.S. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, p.179-182, 1994.

CARBALLAL, G. Introducción al capítulo 14 Familia Reoviridae. In: CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J.R. **Virologia Medica**. Buenos Aires: El Ateneu, p.225-226, 1991.

GASTROENTERITES Virais; Fundação Oswaldo Cruz; protocolo, 1992. Não Publicado.

CONNER, M. E.; RAMIG, R. F. Viral Enteric Diseases. In: NATHANSON, N.; AHMED, R.; SCARANO, F. G.; GRIFFIN, D. E.; HOLMES, K. V.; MURPHY, F. A. ; ROBINSON, H. L. **Viral pathogenesis**. New York: Lippincott – Raven, p. 713 –743, 1997.

KELKAR, S. D.; PUROHIT, S. G.; SIMHA, K. V. Prevalence of rotavirus diarrhoea among hospitalized children in Pune, India. **Indian Journal of Medical Research**. New Delhi , v.109, p.131 –135. 1999.

HO, M. S.; GLASS, R. I.; PINSKY, P. F.; ANDERSON L. L. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.158, p.1112 -1116,1988.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **The Lancet**, Boston, v.2, p.1497, 1973.

KONNO T.; SUZUKI, H.; KATSUSHIMA, N.; IMAI, A.; TAZAWA, F.; KUTSUZAWA, T.; KITAOKA, S.; SAKAMOTO, M.; YAZAKI, N. ISHIDA, N. Influence of Temperature and Relative humidity on Human Rotavirus Infection in Japan. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.147, p.125-128, 1983.

LIPSON, S. M.; ZELINSKY-PAPEZ, K. A.; Comparison of four latex agglutination (LA) and three enzyme-linked immunosorbente assays (ELISA) for the detection of rotavirus in fecal specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v.92, n.5, p.637-643, 1989.

SOUZA, D. F. C.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M. et al. Na outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Reseach**. Bangladesh, v.16, p. 55-59, 1998.

SATO, K.; INABA Y.; SHINOZAKI T.; FUJII R.; MATUMOTO M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. **Archives of Virology**, Viena , v.69, p. 155-160, 1981.

SANTOSHAM, M.; LETSON, W. G.; WOLF, M. et al. A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccine in a native american population. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 163, p. 483-487. 1991.

STALS, F.; WALTHER, F. J.; BRUGGEMAN, C. A. Fecal and Pharyngeal Shedding of Rotavirus and Rotavirus IgA in children with diarrhoea. **Journal of Medical Virology** , v. 14, p. 333-339, 1984.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L., CARSTEN, E. B.; ESTES, M. K.; LENON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYA, M. A.; McGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy**. Academic Press, San Diego, California, 7.ed., p.395-480, 2000.

CHAMPSAUR, H.; QUESTIAUX, E.; PREYOT, J.; HENRY-AMAR, M.; GOLDZSMIDT, D.; BOURJOUANE, M.; BACH, C. Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus shedding. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 149, n.5, p. 667-674, 1984.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia Clínica**. Artes Médicas, São Paulo, p. 68-105, 1989.

RIEPENHOFF-TALTY, M. Unusual manifestations of rotavirus infection. **Virus: Reviews and Research**. Sociedade Brasileira de Virologia, São Paulo, v.5, n.2, p.36, 2000.