



NATALICIA HIFUMI HARA ²²¹

ESTUDO DE ROTAVÍRUS EM
CRIANÇAS SOB ATENDIMENTO
AMBULATORIAL NA CIDADE DE
SÃO PAULO.

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela candidata Natália
Hifumi Hara e aprovada pela Comissão jul-
gadora. 19/03/92*

HHH

Tese apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Imunologia
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas - UNICAMP para
obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio F. ^{ernando} Pestana de Castro

- Campinas -

1992

H212e

16320/BC

OFEREÇO:

À minha família, em especial ao meu pai
"in memorian", que não pode acompanhar
o final deste trabalho, pelo incentivo,
apoio, compreensão e principalmente,

AMOR.

DEDICO:

À Profª Maria Silvia Viccari Gatti
pela minha iniciação científica
com paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, do Instituto de Biologia - UNICAMP, orientador desta tese, pela oportunidade de ingresso na carreira científica

À Profª Maria Silvia Viccari Gatti, do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelas revisões, sugestões e principalmente pelo incentivo fundamental para a realização deste trabalho, assim como pela amizade em todas as etapas do mesmo.

À Profª Dra Maria Lucia Rácz, do Instituto de Ciências Biomédicas - USP, pela realização do Ensaio imunoenzimático para subgrupos de rotavírus e pela revisão e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, do Instituto de Biologia - UNICAMP, pela revisão e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo, do Instituto de Biologia UNICAMP, pela colaboração, sugestões e revisão.

À técnica Mirtis Maria Giaciani Ferraz, pela amizade e auxílio na execução das técnicas.

À Escola Paulista de Medicina, na pessoa da Profª Dra Tânia Aparecida Tardelli Gomes, pela confiança no nosso trabalho e envio de material a ser analisado.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia - UNICAMP, pela amizade.

Ao Gastrocentro, na pessoa de Nancy Nishimura e equipe do Projeto JICA, pela compreensão e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Ademir J. Petenate, do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação - UNICAMP, pela execução e orientação dos cálculos estatísticos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. População estudada.....	23
3.1.1. Faixa etária.....	23
3.2. Ficha clinica-epidemiológica.....	23
3.3. Coleta de amostras de fezes.....	24
3.3.1. Preparo das amostras de fezes para a pesquisa de agentes virais.....	24
3.4. Preparo do ácido nucléico viral.....	24
3.4.1. Da amostra padrão.....	24
3.4.2. Das amostras de fezes.....	26
3.5. Técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)...	27
3.5.1. Coloração do gel.....	28
3.5.2. Classificação dos eletroferotipos.....	29
3.6. Ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus (EIERA).....	30
3.6.1. Reagentes para EIERA.....	31
3.6.2. Técnica de EIERA.....	32
3.6.3. Leitura e interpretação.....	35

3.7. Determinação de subgrupos de rotavírus por ensaio imunoenzimático (EIE).....	36
3.7.1. Reagentes para EIE.....	36
3.7.2. Técnica de EIE.....	37
3.7.3. Leitura e interpretação.....	39
3.8. Análise dos resultados.....	41
3.8.1. Cálculo Estatístico.....	41
3.8.1.1. Método da diferença entre proporções.....	41
3.8.1.2. Método de Mantel-Haenszel.....	42
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	69
7. RESUMO.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9. APÊNDICE.....	94

1. INTRODUÇÃO

Os rotavírus são vírus icosaédricos classificados dentro da família Reoviridae, cujas partículas completas têm um duplo capsídeo (interno e externo) e, pela forma em roda com que estes se apresentam em microscopia eletrônica, foi-lhes dado o nome de rotavírus (59). As partículas completas medem aproximadamente 70 nm de diâmetro e também são conhecidas como partículas lisas ou "smooth", pois a margem mais externa do capsídeo externo possui uma aparência circular lisa e bem definida. As partículas incompletas ou partículas rugosas ou "rough" são assim denominadas devido a perda do capsídeo externo liso e medem aproximadamente 55 nm de diâmetro. Dentro do capsídeo interno está o cerne, que mede em torno de 37 nm de diâmetro e que contém o ácido nucléico viral (55). O genoma deste grupo de vírus, com um peso molecular total de 11 a 14×10^6 é composto por RNA de dupla fita ("double stranded", ds), segmentado, com 11 segmentos de peso molecular variando entre 0.2 a 2.0×10^6 (31). Na eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) o ácido nucléico viral pode ser visualizado e pela ordem de migração dos 11 segmentos, o segmento de RNA mais lento é denominado segmento 1 e assim sucessivamente (44).

A camada interna do capsídeo é composta por pelo menos 4 proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP6). A proteína VP1, com peso molecular de 125.000 é codificada pelo 1º segmento

genômico e uma pequena quantidade desta está presente no virion, sugerindo que esta possa fazer parte de um complexo enzimático, apresentando uma certa homologia com a RNA polimerase (20). A proteína VP2, codificada pelo 2º segmento genômico, com um peso molecular de 102.000, é encontrada em grande concentração no capsídeo interno (64). Não se conhece bem a sua função. Talvez tenha alguma interação com RNA e, conforme relatado por alguns autores, essa proteína possui uma maior afinidade para RNA simples fita ("single stranded", ss) do que para RNA(ds). A VP2 inicia a encapsidação, condensando-se em torno dos 11 segmentos em uma única fita simples de RNA, para então, formar uma partícula madura do cerne, após o qual ocorre a síntese de RNA(ds). Essa ligação do VP2 ao RNA é comparável à ligação celular de proteínas ligantes de RNA e, provavelmente não seja uma associação firme e irreversível (11). A proteína estrutural em menor concentração ("minor") ou seja a VP3, com peso molecular de 98.000, é codificada pelo 3º segmento genômico e, em gel de poliacrilamida, pode migrar juntamente com a proteína VP4 do capsídeo externo. Por sua homologia com RNA-polimerases de outros vírus, foi sugerido que essa proteína também estaria envolvida na replicação do ácido nucléico viral (65). A proteína VP6, que é aquela encontrada em maior quantidade no virion possui um peso molecular aproximado de 42.000. é codificada pelo 6º segmento genômico, sendo altamente imunogênica e antigênica. Contém o antígeno específico para subgrupo e sorogrupo dos rotavírus e também epítomos comuns para o grupo A de rotavírus (39, 104).

O capsídeo externo contém 2 proteínas estruturais, VP4 e VP7. A proteína VP4, com peso molecular de 88.000, representa a hemaglutinina viral. É codificada pelo 4º segmento genômico e, biologicamente, é considerada como um dos antígenos responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes (47), como determinante de virulência e crescimento dos rotavírus em culturas de células (81). Na presença de tripsina, a VP4 é clivada nas proteínas VP5* com peso molecular de 60.000 e VP8* com peso molecular de 28.000 e dessa clivagem resulta um aumento da infectividade viral (21, 30). Alguns autores têm sugerido que a VP4 induz imunidade em animais e crianças, devido à sua imunogenicidade (81).

A glicoproteína VP7, com peso molecular de 37.000, é o principal antígeno de neutralização dos rotavírus e serve como base para determinação dos sorotipos deste grupo de vírus (69, 96). Estudos iniciais, onde rotavírus recombinantes são analisados quanto especificidades genotípica e antigênica, indicaram que a maioria dos anticorpos neutralizantes estavam direcionados contra a proteína VP7, que é codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 e 9, dependendo da cepa viral (39, 69).

Além dessas 6 proteínas estruturais, são conhecidas também as 5 proteínas não estruturais (NS26, NS28, NS34, NS35 e NS53). No entanto, pouco se sabe sobre as suas funções e supõe-se que essas proteínas exerçam algum papel no ciclo de replicação viral. Em relação à proteína NS26, ainda há dúvidas se o produto do 11º segmento genômico, com peso molecular 21.000, faz parte do

virion. Contudo, primariamente ela era classificada como proteína estrutural (31) e, recentemente, como proteína não estrutural (56). Esta situação, no entanto, ficou esclarecida quando se conseguiu preparar antissoro específico anti-NS26 e tornou-se disponível a expressão do gene clonado e sua respectiva sequência de nucleotídeos (74). Atualmente, sabe-se, que a referida proteína está localizada no viroplasma e isso sugere que a mesma possa estar envolvida na replicação do RNA (28). A glicoproteína NS28, com peso molecular 20.000, é codificada pelo 10º segmento genômico. Recentemente Kabcenell et alii (51), demonstraram por imunofluorescência, usando anticorpos monoclonais específicos para NS28, que esta proteína está localizada na periferia do corpo de inclusão viroplásmico encontrado no citoplasma de células infectadas por rotavírus. Esta proteína está envolvida na morfogênese e sua função é de receptor de RNA(ss) (73). A proteína NS34, codificada pelo 7º segmento genômico, com peso molecular 34.000, tem sido encontrada em complexos isolados de células infectadas que contêm atividade de replicação. Esse dado sugere que a NS34 pode ser também um componente da replicação viral (41). A proteína NS35 com peso molecular 36.000, pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da cepa do vírus. Através de experimentos imuno-citoquímicos essas proteínas têm sido localizadas em associação com o viroplasma em células infectadas (86), sendo detectadas em partículas subvirais isoladas de células infectadas e caracterizadas por possuírem atividade de

replicação. A proteína NS53 com peso molecular 58.000, é codificada pelo 5º segmento genômico e tem sido encontrada em células infectadas, mas não em partículas do vírus (44).

A proteína VP6 que define a especificidade de grupo dos rotavírus está localizada no capsídeo interno e constitui aproximadamente 51% das proteínas do virion (64). É conhecida também como proteína "major". Através de testes de ensaios imunoenzimáticos ou hemaglutinação por imunoaderência têm sido detectados antígenos de subgrupos sorologicamente distintos, designados como subgrupos, I e II (75), ou simplesmente antígenos SI ou SII (122).

Logo após a descoberta dos rotavírus humanos ficou estabelecido que todas as amostras possuíam um antígeno comum, situado no capsídeo interno (124). Após constatação de que as especificidades sorológicas encontradas entre os rotavírus nos testes de fixação de complemento (F.C.), imunomicroscopia eletrônica (IME) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) eram distintas das especificidades neutralizantes e que, além do mais, elas eram codificadas por genes diferentes, Kapikian et alii (56), propuseram uma classificação sorológica para os rotavírus, onde os termos subgrupo e sorotipo foram adotados, respectivamente, para designar estas diferenças. Conforme propôs a Organização Mundial de Saúde (OMS) (122), os subgrupos de rotavírus são designados por números romanos e até o momento existem apenas dois subgrupos descritos, denominados I e II. Os sorotipos são designados por números arábicos, conhecendo-se até

o momento 6 sorotipos humanos, 1, 2, 3, 4, 8 e 9 (2, 20). Recentemente, Urasawa et alii (116), através de testes de neutralização com antissoro hiperimune, sugeriram a existência de mais sorotipos, diferentes dos 6 previamente reconhecidos de rotavírus humanos.

Os antígenos que determinam o sorotipo estão localizados em duas proteínas do capsídeo externo dos rotavírus: a glicoproteína VP7 codificada pelo 7º, 8º ou 9º segmento genômico, que se constitui no determinante primário da especificidade de sorotipo e a proteína VP4 codificada pelo 4º segmento genômico, que representa a hemaglutinina viral e exerce um papel secundário na especificidade de sorotipo. Estudos iniciais falharam em identificar o produto do segmento 3 e a proteína do gene 4 era denominado de VP3 (67). Estudos recentes mostraram que o gene do segmento 3 codifica uma proteína estrutural localizada no capsídeo interno que, por coerência, foi denominada VP3 e o produto do gene 4 foi designado VP4 (64).

Através de estudos pela técnica de reação de neutralização em placa observou-se que antissoros hiperimune levavam à neutralização de 2 sorotipos de rotavírus isolados de criança recém-nascida. Uma análise sorológica e genética deste rotavírus indicou que as proteínas VP4 e VP7, do capsídeo externo, participavam separadamente em relação aos 2 sorotipos. Isto significa que a especificidade de neutralização dessas proteínas é independentemente segregada na natureza. Por isso a necessidade do sistema de classificação binária de rotavírus ter

sido sugerida para identificar o papel independente de especificidade de neutralização de VP7 e VP4 (47).

Para identificar os sorotipos de rotavírus, em relação à especificidade antigênica da glicoproteína VP7, utiliza-se o prefixo G, derivado de glicoproteínas. Até o momento estão bem estabelecidos 11 sorotipos (G1 a G11) (55, 108). Para a especificidade da proteína VP4, utiliza-se o prefixo P, pelo fato desta proteína ser sensível a proteases. Apesar de 9 diferentes especificidades de VP4 terem sido relatadas, a tipagem sistemática de rotavírus humano e de origem animal, em relação a VP4, não foi ainda realizada (108). Dentro dos 11 sorotipos conhecidos, 6 destas são de rotavírus humanos do grupo A, designados por G1 a G4, que são mais frequentemente encontrados e, G8 e G9 descritos recentemente (55). Urasawa et alii (116), sugeriram a existência de um 7º sorotipo humano que seria sorologicamente distinto dos outros já descritos.

Os outros 4 sorotipos estão bem estabelecidos como de origem animal, sendo o sorotipo G5 de suínos e equinos, sorotipo G6 de bovinos (120); sorotipo G7 de aves, sorotipo G11 de suínos e sorotipo G10 de bovinos (108).

Conforme Kalica et alii (52), os 11 segmentos do ácido nucléico viral dos rotavírus estão distribuídos em 4 classes de acordo com seus diferentes pesos moleculares. Assim, na classe I estão incluídos os 4 segmentos (1 a 4) com peso molecular entre $1,4$ a $2,4 \times 10^6$; na classe II, 2 segmentos (5 e 6) com peso molecular de $0,75$ e $1,18 \times 10^6$; na classe III outros 3 segmentos

(7 a 9) com uma variação no peso molecular entre $0,5$ a $0,3 \times 10^6$ e, na classe IV os dois segmentos (10 e 11) com menor peso molecular de $0,15$ e $0,28 \times 10^6$. A migração destes segmentos de RNA em eletroforese em gel de poliacrilamida possibilitou a caracterização de um padrão típico de migração de rotavírus do grupo A.

Em 1978, Kalica et alii (54) observaram que comparando os segmentos de RNA de rotavírus humanos, ocorriam diferenças de migração do RNA viral intra-espécies. Vários outros trabalhos citados por Estes et alii (31), confirmaram a grande diversidade do genoma, tanto dos rotavírus humanos como dos rotavírus de outras espécies animais.

Numa tentativa para distinguir e caracterizar melhor estas diferenças no padrão de migração de RNA dos rotavírus, Lourenço et alii (65), propuseram um esquema de classificação onde, além dos 11 segmentos serem agrupados nas 4 classes já referidas, seriam identificadas as diferenças existentes na migração relativa dos segmentos dentro de cada classe, tendo como padrão o RNA do rotavírus SA11, isolado de macacos.

Esse padrão de migração de RNA dos rotavírus ou eletroforetípos, é observado através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e é característico e constante para as diferentes cepas de vírus. Os rotavírus do grupo A, identificados em vários países, exibem uma grande quantidade de eletroferotípos diferentes (19, 49, 100). A determinação do eletroferotipo é importante em estudos epidemiológicos, pois

pode-se determinar a prevalência de diferentes cepas de rotavírus em localidades e épocas distintas e também determinar a origem de surtos de gastroenterites por estes vírus. Entretanto, o eletroferotipo não pode ser utilizado para a classificação sorológica pois existem rotavírus do mesmo sorotipo com eletroferotipos diferentes e rotavírus de sorotipos distintos com o mesmo padrão eletroforético (85).

A respeito de uma possível correlação entre os tipos eletroforéticos e especificidades antigênicas dos rotavírus, Kalica et alii (53), encontraram uma correlação entre o padrão de migração de ácido nucléico, mais precisamente dos segmentos 10 e 11 e o subgrupo antigênico. Quando os 2 segmentos apresentavam uma migração mais lenta este padrão era conhecido como padrão "curto", enquanto que, a migração mais rápida correspondia ao padrão "longo".

Uma outra classificação em relação a estes padrões foi descrita e denominada padrão "super-curto", onde a migração do segmento 11 é mais lenta ainda que a do padrão curto (71). Mais recentemente, este padrão também foi encontrado em amostras de rotavírus bovino (111). Para estes rotavírus de origem animal não foi possível a sua classificação quer no subgrupo I quer no subgrupo II (46, 104).

Em relação aos rotavírus humanos, o padrão curto e super curto correspondiam ao subgrupo I, enquanto que o padrão longo ao subgrupo II (2, 48). Porém, através da análise genética de várias amostras de rotavírus recombinantes, ficou demonstrado

que o antígeno de subgrupo se localiza na proteína VP6, codificada pelo segmento genômico 6. Já o padrão longo e/ou curto é determinado por alterações na mobilidade somente do segmento 11 do RNA viral e não na redução da mobilidade de ambos os segmentos 10 e 11 (27).

Nakagomi et alii (77), foram os primeiros a mencionarem a detecção de rotavírus humanos do subgrupo I com padrão longo de migração do RNA. Recentemente, vários autores têm relatado o aparecimento de rotavírus humanos do grupo A com especificidade para subgrupo I e padrão longo de migração eletroforético e esses dados constituem fortes evidências da não validade da ligação subgrupo ao eletroferotipo dos rotavírus do grupo A (36, 116).

Desde 1980, os rotavírus do grupo não-A, atípicos, ou "pararotavírus" têm sido relacionados a diarreia em porcos, galinhas e em humanos (13, 79). Estes vírus, apesar de apresentarem a mesma morfologia dos rotavírus do grupo A, possuem antígenos de grupo diferentes, não sendo assim detectados nos testes sorológicos utilizados na rotina para os rotavírus do grupo A, onde anticorpos específicos anti-grupo A são utilizados. Embora os rotavírus atípicos conservem os 11 segmentos de RNA, seus perfis eletroforéticos são claramente distintos (10, 14). Isto permite a sua identificação preliminar e sugestiva, principalmente pela ausência do agrupamento da tríade de RNAs da classe III do grupo A, ou seja, dos segmentos 7, 8 e 9 (15) e, também, em menor proporção, diferenças relacionadas à classe II. Os rotavírus atípicos podem também se distinguir entre si

sorologicamente e pela eletroforese (98). Até o momento, são reconhecidos 6 grupos sorológicos antigenicamente distintos (A a F) e mais um grupo G do qual existem evidências preliminares (15). Rotavírus dos grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos como em animais e rotavírus dos grupos D, E e F, têm sido detectados somente em animais (28).

O grupo B de rotavírus é também chamado de rotavírus da diarreia do adulto (ADRV), e se tornou conhecido após epidemia de diarreia aquosa em adultos na China em 1982. Estudos soroepidemiológicos têm demonstrado que anticorpos específicos para grupo B em soro humano raramente são encontrados em outras regiões além da China (50, 90).

Os rotavírus do grupo C foram detectados em humanos e suínos causando severa diarreia. A maioria dos casos humanos tem sido esporádica ou ocorrendo em pequenos grupos, apesar de terem sido relatadas epidemias na Inglaterra (17, 18) e Japão (70). Devido à baixa prevalência em humanos contrastando com a alta frequência em porcos, Saif et alii (91), sugerem que a rotavirose humana causada pelo grupo C possa ser uma zoonose.

Para a identificação e caracterização dos rotavírus, a primeira técnica utilizada foi a microscopia eletrônica (M.E). Bishop et alii (8), examinando finas secções de biópsias de mucosa duodenal obtidas de crianças com diarreia aguda, detectaram partículas virais, denominadas mais tarde de rotavírus. Logo em seguida, pelo mesmo método, Flewett e Bishop, identificaram rotavírus em fezes (8, 32). Este método possui

vantagens pela sua grande especificidade e pelo fato desses vírus possuírem uma morfologia distinta e característica, não havendo necessidade de se usar a técnica de imuno microscopia eletrônica (I.M.E). Além do mais a M.E permite a detecção de rotavírus do grupo não-A, já que estes apresentam morfologia semelhante (112). Quando há poucas amostras a serem analisadas esse é o método de diagnóstico mais rápido, uma vez que as amostras de fezes podem ser coradas com ácido fosfotungstíco (PTA) e examinadas diretamente em poucos minutos, permitindo a detecção de rotavírus em aproximadamente 90% dos casos (12).

Uma das grandes dificuldades do estudo dos rotavírus foi sua não adaptação aos cultivos celulares rotineiramente usados. Ao invés de efeito citopático foram observadas infecções abortivas e o vírus infeccioso não podia ser passado seriadamente nos cultivos celulares. As amostras de rotavírus humanos mostraram uma maior dificuldade em serem cultivadas, quando comparadas com as amostras de origem animal. O primeiro rotavírus humano a ser cultivado em cultura de tecidos foi o mutante Wa, obtido após passagens sucessivas em suínos gnotobióticos e adaptado ao crescimento em células primárias de rim de macaco (AGMK). O uso de culturas celulares em linhagem contínua, como a MA-104 e a descoberta das propriedades "ativadoras" da tripsina nos rotavírus, facilitaram o isolamento desses vírus (90).

Estes et alii (30), descreveram o mecanismo molecular da ativação dos rotavírus pela tripsina. A adição desta, permite

a clivagem proteolítica da proteína VP4 do capsídeo interno, resultando em VP5* e VP8*, convertendo as partículas não infecciosas em infecciosas, pelo favorecimento da penetração do vírus nas células.

Mais recentemente foram desenvolvidas técnicas diretas do cultivo de rotavírus humanos e de animais com o uso de culturas tipo "roller". Esta técnica consiste no pré-tratamento do vírus com tripsina, incorporação de tripsina ao meio de manutenção e uso de linhagens celular MA-104 em tubos rolantes com incubação a 37° C das culturas inoculadas. A adaptação dos rotavírus em cultivos celulares permite a quantificação das partículas virais através de plaqueamento bem como grande parte das amostras fecais positivas para rotavírus do grupo A podem ser cultivadas por este método (94). O desenvolvimento de técnicas de cultivo para diferentes amostras de rotavírus possibilitou a identificação do vírus por ensaios convencionais, que incluem a neutralização do efeito citopático, redução no número de placas e a interferência viral (90).

Os rotavírus dos grupo não-A são considerados como de difícil cultivo, mas já existem alguns trabalhos sobre a propagação de vírus dos grupos B e C em células primárias (109, 113).

A propagação dos rotavírus em linhagens celulares contínuas foi um passo extremamente importante, pois se tornou possível obter uma maior quantidade do vírus, facilitando a execução de técnicas sorológicas e genéticas mais modernas,

aplicadas ao estudo desses vírus. Anteriormente estes estudos tinham que ser realizados com rotavírus purificados diretamente das fezes, o que se constituia em um fator limitante pela quantidade de vírus obtida (22, 60).

O teste sorológico mais utilizado para a detecção de rotavírus é o ensaio imunoenzimático (ELISA), uma vez que se trata de uma prova rápida, específica e altamente sensível. O ensaio pode ser realizado de diferentes modos (125) e, a técnica mais comumente usada é a chamada de sanduiche duplo (118). Neste ensaio, amostras em teste são adicionadas em concavidades de placas plásticas ou então, em pérolas previamente cobertas com anticorpo de captura. A presença do antígeno é subsequentemente determinado pelo 2º anticorpo preparado em um animal de espécie diferente da usada para preparo do soro de captura. O 2º anticorpo "detector" é então revelado pelo anticorpo anti-IgG espécie-específico, conjugado com uma enzima que na reação apresenta uma coloração com um substrato apropriado. Já na detecção de rotavírus do grupo B, mede-se os anticorpos direcionados contra esses vírus, através do uso de imunoreagentes específicos com anticorpo monoclonal para o grupo B (78).

Com o mesmo teste de ensaio imunoenzimático, usando antissoros absorvidos ou anticorpo monoclonal sorotipo específico (anti-VP7) pode-se, também, identificar cada um dos 6 sorotipos de rotavírus humanos distintos e já bem definidos (7). Dessa mesma forma, com a utilização de anticorpo monoclonal subgrupo específico (anti-VP6), pode-se determinar os subgrupos I ou II

dos rotavírus do grupo A (39).

Para uma análise mais específica do sorotipo foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático competitivo, que mede a resposta imune epítipo-específica para sorotipo individual de rotavírus, avaliando-se assim, a resposta epítipo característica. Nesta técnica, emprega-se o soro teste como reagente bloqueador e os anticorpos monoclonais como reagente detector (96).

Em se tratando de uma triagem para o diagnóstico de rotavírus diretamente das fezes, o teste de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é o mais comumente utilizado, por se tratar de um teste rápido e sem a necessidade da utilização de reagentes sorológicos específicos. A técnica de EGPA permite o diagnóstico dos rotavírus devido à sua capacidade de separar com facilidade os 11 segmentos de RNA(ds) típicos deste grupo de vírus, através da variação da migração no gel de poliacrilamida. Determina-se assim os eletroferotipos, que são importantes em estudos epidemiológicos, pois pode-se avaliar a prevalência de diferentes cepas de rotavírus em localidades e épocas distintas, como também determinar a origem de surtos de gastroenterites por rotavírus.

A grande vantagem deste teste é que os rotavírus dos grupo A e não-A possuem perfis claramente distintos e assim é possível a identificação preliminar e sugestiva dos rotavírus não-A, pela ausência da tríade de RNAs da classe III do grupo A e também, em menor proporção, das diferenças relacionadas a classe II (15).

Evidentemente, a grande desvantagem desta técnica é que não se pode utilizá-la para a classificação sorológica, necessitando de outro método específico, pois existem rotavírus com mesmo sorotipo e com padrões eletroferotipos diferentes e rotavírus de sorotipos distintos com o mesmo padrão eletroforético (85), como mencionado anteriormente.

Um método bastante sensível e altamente específico na detecção de rotavírus em fezes é baseado na hibridização "in dot" de RNA(ss) de rotavírus marcado por transcrição com RNA(ds) desnaturado e imobilizado sobre uma membrana de nitrocelulose (33). Este método mostra excelente concordância com outros testes tais como M.E, EGPA e ELISA.

A técnica mais recentemente desenvolvida para tipificar rotavírus é a "Polimerase Chain Reaction" (PCR), que consiste na amplificação de pequenos segmentos de RNA; desse modo grande número de amostras distintas de rotavírus têm sido identificadas e estudadas, em termos de subgrupos I e II (120) e dos 6 sorotipos humanos conhecidos (38).

Atualmente os rotavírus são considerados como um dos mais importantes agentes etiológicos não bacterianos da diarreia em crianças e jovens no mundo inteiro (55). Em países desenvolvidos, apesar de não serem uma importante causa de mortalidade infantil, os rotavírus ocorrem com prevalência considerável em crianças (6). Embora a diarreia possa ser considerada uma das doenças mais comuns em crianças, ela assume um significado especial nos países menos desenvolvidos onde as

taxas de morbidade e mortalidade são alarmantes (24). Uma análise feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) nesses países, indica que as diarreias são responsáveis primários por 15 a 34% de todas as mortes que ocorrem durante a infância (121). Em 1975, foi estimado que 450 milhões de episódios de diarreia ocorreram em crianças menores que 5 anos de idade na Ásia, África e América Latina e que de 1 a 4% destes foram fatais (89). Nessa estimativa, a morte de 5 a 18 milhões de crianças foi atribuída à diarreia. Mais recentemente, foi calculado que, nessas regiões, existiriam de 3 a 5 bilhões de casos de diarreia e entre 5 a 10 milhões de mortes associados a ela num período de 1 ano (1977/1978), considerando-se assim, a diarreia como a primeira dentre as doenças infecciosas, tanto em relação à frequência como também à mortalidade (119). Em uma outra análise, de estudos selecionados, foi estimado que ocorrem entre 774 milhões a 1 bilhão de episódios de diarreia (considerando-se que episódios de diarreia podem ocorrer no mesmo indivíduo, mais que uma vez ao ano ou mesmo no período de estudo). Destes, 4,6 milhões de mortes pela doença ocorreram, em crianças menores que 5 anos de idade na África, América Latina e Ásia (excluindo-se a China) (99).

Em se tratando de infecções intestinais causadas por bactérias os principais agentes são encontrados na família Enterobacteriaceae, nos gêneros Salmonella, Shigella e na espécie Escherichia coli, além de outros agentes como Vibrio e Campylobacter (114). Mais de 60% dos casos de diarreia infantil estão relacionados com esses agentes enteropatogênicos,

principalmente a *E.coli enteropatogênica clássica* (EPEC). No Brasil, colibacilos deste grupo são os agentes mais frequentes da diarreia infantil, ocorrendo sobretudo no 1º ano de vida. A razão da grande prevalência de EPEC em crianças desta faixa etária ainda permanece desconhecida.

Em estudos feito por Guerrant et alii (40), em populações de até 30 meses de idade no Nordeste do Brasil, a mortalidade precoce foi maior que 14% durante os 5 primeiros anos de vida. Deste total, em 52% dos casos a diarreia foi considerada como causa primária ou associada ao fato.

Até a década de 70, em vários casos de diarreia não era identificado nenhum agente viral como causa da doença. No entanto, como foi mencionado anteriormente, a partir de 1973, Bishop et alii, descreveram uma partícula viral de 70 nm em biópsias duodenais de crianças com gastroenterites agudas o que, logo depois, foi também observado por outros autores (32, 57). Ficou então demonstrado que aquelas partículas, denominadas então de Rotavírus, eram também responsáveis por uma diarreia severa em crianças. Anteriormente já haviam sido descritos vírus semelhantes em camundongos (1) e macacos (66) e posteriormente em outros animais (72). A partir dessas observações, os rotavírus passaram então a ser considerados como os mais importantes agentes etiológicos de gastroenterites de origem não bacteriana infectando uma ampla variedade de aves e mamíferos, incluindo humanos (44).

A frequência de diarreia por rotavírus é menor durante os primeiros 6 meses de idade, talvez devido à transferência de anticorpos do tipo IgG materno via transplacentária. A partir desta faixa etária, esta imunidade passiva tende a diminuir, o que poderia explicar o fato de, entre 6 a 24 meses de idade a rotavirose ocorrer, mais frequentemente, como uma enfermidade mais grave, com sintomas evidentes de uma diarreia aquosa que se apresenta subitamente. O período de incubação para a infecção por rotavírus tanto em crianças como em adultos experimentalmente inoculados, é de 1 a 3 dias (58). De modo geral o início da doença é caracterizado por uma diarreia severa e aquosa, vômitos e pouca febre (88). A duração média da rotavirose é de 5 a 8 dias e a concentração dos rotavírus nas fezes alcança seu título máximo logo após o início da diarreia e diminui gradualmente, entre 9 e 10 dias (76, 117).

A infecção por rotavírus é uma doença auto-limitada, que leva à descamação rápida e extensiva do epitélio colunar das vilosidades do intestino delgado, com substituição por um epitélio cubóide indiferenciado. Esta alteração leva ao encurtamento e atrofia das vilosidades com prejuízo do processo de absorção-digestão, que ocorre normalmente no lúmen das vilosidades. Consequentemente, advém uma diarreia do tipo osmótica, por má-absorção e que persiste até a reposição do epitélio colunar das vilosidades (9, 110).

Aspectos clínicos comuns da diarreia por rotavírus são desidratação isotônica e acidose metabólica compensada. A

desidratação pode ocorrer em 40 a 83% dos casos (25). Em amostras de fezes de pacientes com diarreia causada por rotavírus, tem sido evidente um aumento na concentração de ions Na^+ e Cl^- , e uma baixa concentração de açúcar (106). As fezes são frequentemente líquidas, sem sangue, sem leucócitos fecais, mas algumas vezes pode-se observar a presença de muco (43).

Vários estudos foram realizados, com o objetivo de se determinar se a rotavirose em crianças apresentava ou não uma distribuição sazonal (43, 97). Nos países de clima frio ficou evidenciada esta característica, ocorrendo uma maior incidência de rotavírus nos meses mais frios do ano.

De acordo com Hieber et alii (43) e Stintzing et alii (102), em países de climas temperados, observou-se que não ocorria um padrão sazonal das infecções por rotavírus. Em outras palavras, a infecção não ocorria somente nos meses frios, mas em praticamente todos os meses do ano.

Trabalhos anteriores realizados no Brasil (63, 84, 103), têm procurado estudar a rotavirose em crianças sob atendimento hospitalar ou não. A maioria deles tem se baseado principalmente no estudo dos perfis eletroforéticos e na detecção do grupo A de rotavírus. Poucos estudos têm sido feitos no entanto, visando outros parâmetros, como a subgrupagem ou mesmo a sorotipagem dos RNA identificados.

No presente estudo, além de analisarmos amostras de fezes de crianças com e sem diarreia, sob atendimento ambulatorial, procuramos com relação aos parâmetros anteriormente

citados, averiguar outros aspectos epidemiológicos como os subgrupos dos rotavírus.

2. OBJETIVOS

2.1. Analisar a presença de rotavírus em crianças não internadas, atendidas em ambulatório, na cidade de São Paulo, estando elas:

- a) com diarreia (amostras-caso)
- b) sem diarreia (amostras-controle)

2.2. Analisar a distribuição das amostras positivas para rotavírus durante um período de 12 meses.

2.3. Identificar os subgrupos sorológicos das amostras positivas para rotavírus identificadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaio imunoenzimático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População estudada

A população estudada no presente trabalho constituiu-se em 1010 crianças, de 0 a 6 anos de idade com e sem episódios de diarreia. Foram coletadas amostras de fezes destas crianças em um período de 12 meses consecutivos, de abril de 1989 a março de 1990 atendidas no ambulatório do Hospital Menino Jesus, no município de São Paulo, S.P. Destas amostras, 505 provinham de crianças que apresentavam diarreia (amostras-caso), numeradas de 001.1 à 505.1. Igualmente, outras 505 amostras tidas como controle, numeradas de 001.2 à 505.2 foram coletadas de crianças na mesma faixa etária sem diarreia, no mesmo dia das amostras-caso.

Esta pesquisa foi realizada concomitantemente com o Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, em São Paulo que estudou os possíveis agentes bacterianos responsáveis pelo quadro de diarreia e no Departamento de Microbiologia e Imunologia - I.B. - UNICAMP - onde foi pesquisada a presença de Rotavírus.

3.1.1. Faixa etária

As idades das crianças variaram de 0 a 6 anos e foram por nós agrupadas em sete faixas etárias: 0 a 12 meses, 13 a 24 meses, 25 a 36 meses, 37 a 48 meses, 49 a 60 meses, 61 a 72 meses e 73 meses ou mais.

3.2. Ficha clínica-epidemiológica

No momento da consulta, a pessoa responsável pela criança foi entrevistada e a ficha-protocolo (em apêndice), após preenchida com dados clínico-epidemiológicos referentes ao paciente, foi arquivada na Escola Paulista de Medicina.

3.3. Coleta das amostras de fezes

As amostras de fezes foram colhidas através de "swabs" estéreis, sendo estes então colocados em tubos de ensaio rotulados, contendo Tampão Fosfato Salina (PBS) e conservadas em geladeira a 4^o C até o momento da análise.

Os materiais assim coletados foram então transportados do Hospital Menino Jesus, para a Escola Paulista de Medicina e para a UNICAMP, em recipientes de isopor contendo gelo.

3.3.1. Preparo das amostras de fezes para a pesquisa de agentes virais

Foi utilizado o método de Pereira et alii (84), com algumas modificações. As amostras de fezes foram diluídas em Tampão Fosfato Salina (PBS), pH 7,4, preparando-se suspensões a 10% homogeneizadas num aparelho tipo "Vortex". Em seguida as amostras foram clarificadas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos. Estes sobrenadantes foram mantidos a 4° C e utilizados tanto para as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), como para as de ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus (EIERA) e ensaio imunoenzimático (EIE), para determinação de subgrupos de rotavírus.

3.4. Preparo do ácido nucléico viral

3.4.1. Da amostra padrão

A cepa SA11 de rotavírus de macaco foi utilizada como amostra padrão e controle das reações de EGPA e EIERA. Este antígeno foi obtido através da cultura do rotavírus em células MA-104, cultivadas em meio de Eagle contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), fungizona (0,0125%) e penicilina/estreptomicina (0,005%) na presença de 10 ug de tripsina/ml de meio.

Resumidamente, após a formação da camada de células MA-104 o meio foi descartado e as células lavadas 2 vezes com

solução de Hanks. Em cada garrafa tipo "xarope", foram inoculados 300 ul do vírus, gentilmente cedido pelo Dr. H.G. Pereira, do laboratório de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, R.J.; juntamente com 10 ul de tripsina (10 mg/ml) seguindo-se incubação a 37° C por 1 hora, com agitação periódica. Após este tempo adicionou-se a cada garrafa 20 ml de meio de cultura de manutenção (Eagle sem soro) mais 200 ul de tripsina, sendo as garrafas incubadas a 37° C por 2 a 5 dias até visualização do efeito citopático (ECP) nítido, que se caracteriza pela destruição total das células infectadas, após arredondamento do contorno das mesmas. A fim de romper o maior número de células o meio foi congelado e descongelado por 3 vezes e centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos, obtendo-se assim o vírus de 1ª passagem. Este procedimento foi repetido, até a obtenção do vírus de 5ª passagem. Terminada esta etapa, as partículas virais foram concentrados com Polietileno Glicol 6.000 (PEG) em tubos de diálise com poro de 12.000 ("cut off") até redução de aproximadamente 10 vezes o volume original.

A cada 10 ul deste antígeno, assim preparado, foram adicionados 50 ul de uma solução dissociadora com uréia 5 M (61). Esta mistura foi incubada a 68° C por 3 a 5 minutos, sendo então mantida por até 15 dias a -20° C, para uso na técnica de EGPA.

3.4.2. Das amostras de fezes

O preparo do ácido nucléico viral das fezes em estudo foi feita segundo o método de Pereira et alii (84), com algumas modificações.

A tubos tipo "ependorff" com 400 ul da suspensão de fezes a 10% em PBS, foram adicionados 40 ul de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em água destilada, sendo os tubos incubados a 37° C por 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados a cada tubo 400 ul de uma mistura volume/volume de fenol redestilado-clorofórmio, agitando-se os materiais repetidamente por 10 minutos em um agitador tipo "Vortex", à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, a fase aquosa de cada material foi transferida para outro tubo ao qual foram adicionados 40 ul de uma solução de NaCl a 20% e 1 ml de álcool etílico para precipitação do RNA viral. Após leve agitação, os tubos foram colocados a -20° C, por um período mínimo de 18 horas e então centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então eliminado e o material resultante foi seco a vácuo em dessecador, sob pressão negativa e, aos precipitados formados, foram adicionados 20 ul de uma solução dissociadora (61), incubando-se os tubos a 56° C por 15 minutos. Estes materiais foram utilizados no teste de EGPA.

3.5. Técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) foi feita segundo as recomendações de Pereira et alii (84).

A câmara foi preparada entre duas placas de vidro (14,0 x 16,5 cm) separadas entre si por espaçadores de 1 mm de espessura. O espaço entre as placas de vidro, após estas terem sido seladas com ágar a 1,5% acrescido de 0,1% de SDS, recebeu o gel separador constituído de acrilamida-bis acrilamida a 7%. Após a sua polimerização, foi sobreposto o gel concentrador a 3,5% e, imediatamente, introduzido o pente de aplicação, tomando-se o cuidado de evitar em todas as etapas a formação de bolhas de ar. Após a polimerização do gel superior, as placas foram seladas na cuba para eletroforese, também com o uso do ágar 1,5% mais 0,1% SDS. Nos reservatórios da cuba foram adicionados 200 ml de Tampão de corrida (Tris 0,025 M/glicina 0,192 M, pH 8,3), sendo em seguida o pente retirado cuidadosamente. Com auxílio de uma microseringa foram aplicados nas canaletas 20 μ l de cada amostra a ser analisada. O RNA de rotavírus da amostra SA11, num volume de 5 μ l, foi incluído em todas as corridas eletroforéticas como amostra padrão. Nas canaletas onde não se adicionavam amostras, foram adicionados 10 μ l da solução dissociadora com uréia 5 M.

Em seguida, o polo negativo de uma fonte de corrente contínua foi ligada ao reservatório superior da cuba e o polo positivo ao reservatório inferior, usando-se uma corrente de 10mA

por 18 horas à temperatura ambiente.

3.5.1. Coloração do gel

A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, segundo Sammons et alii (92), modificado por Herring et alii (42).

Após o término da eletroforese, o gel foi transferido da placa para uma cuba de vidro onde se realizaram todos os passos da coloração, utilizando-se luvas para evitar contato manual com o gel. Em primeiro lugar o gel foi fixado por 60 minutos com agitações periódicas, em 200 ml de uma solução contendo 10% de etanol e 0,5% de ácido acético em água destilada. Em seguida, a solução fixadora foi retirada e acrescentou-se 100 ml de uma solução de nitrato de prata 0,11 M, que foi então mantido, sob agitação por 30 minutos, findos os quais o nitrato de prata foi eliminado e o gel lavado rapidamente 3 vezes com água destilada. A revelação foi realizada mediante a colocação por 3 a 5 minutos de 250 ml de uma solução reveladora contendo NaOH 0,75 M, acrescida de formaldeído 0,074 M. Quando ocorria o aparecimento dos segmentos de RNA, esta solução era retirada, sendo adicionados 100 ml de solução de ácido acético 5% para interromper a reação. Para conservação do gel, a solução de ácido acético era retirada e substituída por 100 ml de uma solução de etanol a 10%. Para registro fotográfico do gel, foi utilizado o filme T-MAX ASA100.

3.5.2. Classificação dos eletroferotipos

Foi utilizado o método de Lourenço et alii (65), que propuseram um esquema de classificação que consiste em dividir os 11 segmentos do RNA de rotavírus visualizados pela técnica de EGPA, em 4 classes onde pequenas variações dentro de cada classe podem significar eletroferotipos diferentes. As 4 classes são constituídas por:

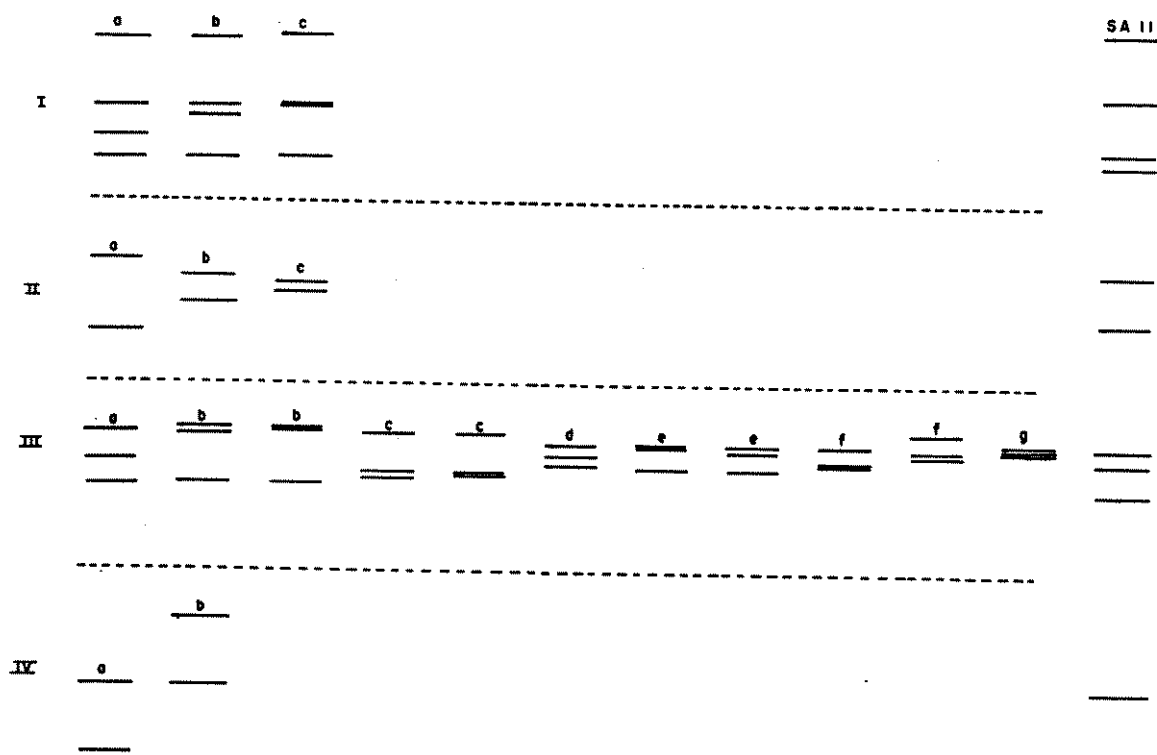
Classe I - segmentos 1 a 4

Classe II - segmentos 5 e 6

Classe III - segmentos 7 a 9

Classe IV - segmentos 10 e 11

Encontramos abaixo o diagrama de Lourenço et alii (65), para a classificação dos tipos eletroforéticos de rotavírus.



3.6. Ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus (EIERA)

Este teste foi realizado com um "kit" fornecido pelo Dr. H.G. Pereira, do Laboratório de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, R.J.; sendo seguidas as recomendações dos autores para a execução do teste (83).

O ensaio é praticado pelo método do sanduíche duplo em que os antígenos são captados em fase sólida por antíssoros obtidos em cabras imunizadas com rotavírus do grupo A e a sua detecção se faz por soros hiperimunes de cobaias anti-rotavírus. A revelação é feita por soro de coelho anti-IgG de cobaia conjugado com peroxidase.

Neste ensaio imunoenzimático, que visa a detecção de rotavírus do grupo A e adenovírus diretamente das fezes, o nosso objetivo foi a detecção somente de rotavírus. No entanto, por se tratar de um teste onde a detecção de um vírus serve como controle da reação para a pesquisa do outro vírus e vice-versa, todas as amostras por nós estudadas foram também avaliadas quanto à presença ou não de adenovírus.

3.6.1. Reagentes para EIERA

- 1 - Soro pós-imune de cabra anti-rotavírus: anticorpo de captura para rotavírus
- 2 - Soro pós-imune de cabra anti-adenovírus: anticorpo de captura para adenovírus
- 3 - Soro pré-imune de cabra: controle negativo de captura para ensaio confirmatório. Este reagente contém os soros pré-ímmunes das duas cabras usadas para preparação dos soros (1) e (2), cada um na mesma concentração dos correspondentes soros pós-ímmunes.
- 4 - Soro ímmune de cobaia anti-rotavírus: anticorpo detector de rotavírus
- 5 - Soro ímmune de cobaia anti-adenovírus: anticorpo detector de adenovírus
- 6 - Soro de coelho anti-IgG de cobaia: anticorpo revelador. Este reagente contém além do soro conjugado 100 vîzes concentrado, 50% de glicerol e 50% de soro normal de cabra, de forma que a diluição 1/100 a ser usada no ensaio conterá 0.5% de soro normal de cabra, destinado a bloquear reação residual inespecífica entre o conjugado e os soros de captura
- 7 - Controle positivo para rotavírus: sobrenadante de cultura de SA11 em células MA-104
- 8 - Controle positivo de adenovírus: cultura de adenovírus tipo 2 em células HEP2

3.6.2. Técnica de EIERA

1ª FASE: Sensibilização da microplaca (96 concavidades) com soros de captura anti-rotavírus e anti-adenovírus .

Os soros foram diluídos a 1/100 em Tampão Carbonato/Bicarbonato 0,25 M pH 9,6 (para cada placa completa foram suficientes 5 ml das diluições de cada soro). Adicionou-se 100 ul das diluições do soro anti-rotavírus às fileiras A, C, E e G e do soro anti-adenovírus às fileiras B, D, F e H da microplaca, que foi incubada durante a noite a 4° C. No dia seguinte a placa foi esvaziada e lavada com Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,4 acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS/T). Essa operação foi repetida 3 vezes com intervalos de 2 minutos com auxílio de pipeta de canais múltiplos. A placa lavada e esvaziada podia ser usada imediatamente ou conservada a -20° C por várias semanas antes do teste.

2ª FASE: Adição das suspensões fecais e dos controles positivos.

Cada amostra foi estudada em duas diluições (1/4 e 1/12) em dois pares de concavidades, contendo cada par um dos anticorpos de captura. Nas colunas ímpares foram distribuídos 75 ul do diluente PBS/T/BSA/EDTA (PBS/T contendo 1% de albumina bovina e EDTA 0.01 M) e nas colunas pares 50 ul do mesmo diluente. Adicionou-se se em seguida 25 ul das suspensões de

fezes nas colunas ímpares (concavidades A1 e B1), transferindo-se, após homogeneização, 25 ul para as colunas pares (concavidades A2 e B2) obtendo-se assim as diluições 1/4 e 1/12 das amostras. Como controle positivo da reação, suspensões de rotavírus e adenovírus foram preparadas em volumes de 100 ul na diluição de 1/10 em PBS/T/BSA. Foram adicionados 25 ul da diluição de rotavírus às concavidades A e B da coluna 11, transferindo-se 25 ul para as concavidades A12 e B12 e procedeu-se da mesma forma para com o antígeno adenovírus nas colunas C e D. Foram ainda colocados 25 ul do diluente PBS/T/BSA às concavidades E, F, G e H da coluna 12, completando volume para 75 ul. O teste foi incubado por 2 horas a 37° C e posteriormente a placa foi lavada 3 vezes como descrito na 1ª fase.

3ª FASE: Adição da mistura de soros anti-rotavírus e anti-adenovírus.

Foi preparada uma diluição contendo 1% dos soros de cobaia anti-rotavírus e anti-adenovírus concentrados e para uma placa completa foram adicionados 100 ul de cada soro em 9,8 ml de PBS/T/BSA. Foram distribuídos 100 ul desta diluição em todas as concavidades da placa, que foi então incubada por 2 horas a 37° C e posteriormente lavada conforme mencionado para a 1ª fase.

4ª FASE: Adição do conjugado.

O soro de coelho anti-IgG de cobaia conjugado com peroxidase foi diluído a 1/100 em PBS/T/BSA, sendo adicionados 100 μ l a cada uma das concavidades da placa, exceto às colunas 11 e 12 nas fileiras G e H (controles do substrato). Posteriormente a placa foi incubada por 2 horas a 37° C e após este período foi lavada conforme descrito na 1ª fase.

5ª FASE: Adição do substrato.

A solução do substrato contendo Tampão Ácido Cítrico/Fosfato 0,1 M pH 5,6 preparada no momento do uso. A estes foram adicionados 0,04% de orto fenilenodiamina (OPD) e 0,15% de H₂O₂ (30 volumes). Cem microlitros deste revelador foram distribuídos em todas as concavidades da placa, sendo a mesma mantida em temperatura ambiente até o aparecimento da tonalidade amarelo nítida nos controles de antígenos diluídos a 1/4 (coluna 11, fileiras A e B) e fraca nas diluições 1/12 (coluna 12, fileiras A e D). Neste momento, as reações foram bloqueadas pela adição de 50 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 M. Após leitura visual, a placa foi imersa em solução de hipoclorito de sódio 1%.

3.6.3. Leitura e interpretação

A reação pode ser lida visualmente e os controles dos antígenos positivos devem mostrar cor amarela intensa nas diluições a 1/4 (nas concavidades 11A para rotavírus e 11D para adenovírus) e cor mais pálida nas diluições 1/12 (depressões 12A e 12D), porém nitidamente mais forte que a dos controles do conjugado e substrato (colunas 11 e 12, fileiras E, F, G e H).

Foram consideradas positivas as amostras que no mínimo em uma das diluições testadas apresentou cor amarelo nítida e intensa. Como não há reações cruzadas entre rotavírus e adenovírus, os soros detectores são combinados em uma única mistura, contendo concentrações otimizadas dos respectivos anticorpos. A especificidade é conferida pelos soros de captura que são usados separadamente. Amostras contendo rotavírus ou adenovírus devem reagir apenas na presença do respectivo soro de captura. Reações na presença de ambos os soros de captura podem indicar a existência dos dois vírus no material examinado ou, eventualmente, uma reação inespecífica, recomendando-se nestes casos a confirmação específica do teste.

3.7. Determinação de subgrupos de rotavírus por Ensaio Imunoenzimático (EIE)

Este teste foi realizado pela Prof^a Dra Maria Lúcia Rácz do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, da Universidade de São Paulo, S.P.

3.7.1. Reagentes para EIE

- 1 - Soro hiperimune de coelho, diluído 1/50: anticorpo de captura para rotavírus
- 2 - Extrato fecal positivo para rotavírus subgrupo I
- 3 - Extrato fecal positivo para rotavírus subgrupo II
- 4 - Anticorpo monoclonal para antígeno de rotavírus do subgrupo I
- 5 - Anticorpo monoclonal para antígeno de rotavírus do subgrupo II
- 6 - Anticorpo monoclonal para antígeno grupo-específico A de rotavírus
- 7 - Soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina

As amostras dos itens 4 a 7 foram gentilmente cedidas pelo World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Rotavírus, East Birmingham Hospital, Birmingham, UK (5). Esta técnica já se encontra implantada no Laboratório de

Virologia do Departamento de Microbiologia, I.C.B., da Universidade de São Paulo.

3.7.2. Técnica de EIE

1ª FASE: Sensibilização da microplaca com soro de captura.

Foram colocados 100 ul de soro hiperimune de coelho diluído 1/5.000 em Tampão Carbonato/Bicarbonato 0,25 M pH 9,6 e em seguida, a placa foi incubada durante a noite a 40°C. No dia seguinte foi esvaziada e lavada com Tampão Fosfato Salina (PBS), pH 7,4 acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS/T). Essa operação foi repetida 6 vezes em curtos intervalos.

2ª FASE: Adição dos controles positivos de rotavírus dos subgrupos I e II e suspensões fecais.

Adicionou-se 75 ul de PBS/T/EDTA (PBS/T contendo EDTA 0,01 M) em todas as concavidades da microplaca. Em seguida, foram adicionados 25 ul de controle positivo para rotavírus subgrupo I em cada 6 concavidades, a saber, 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B e 25 ul de controle positivo para rotavírus subgrupo II em 6 outras concavidades, a saber, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A e 6B, etc. Os extratos fecais foram adicionados da mesma forma. A placa foi incubada durante a noite a 40°C e no dia seguinte, seguiu-se com o processo de lavagem da 1ª fase.

3ª FASE: Adição dos anticorpos monoclonais específicos para subgrupo I e II e grupo específico de rotavírus.

Foram adicionados, à microplaca:

- 100 µl de anticorpo monoclonal específico subgrupo I de rotavírus, na diluição 1:10.000, em todas as concavidades das colunas 1, 4, 7 e 10.
- 100 µl de anticorpo monoclonal específico subgrupo II de rotavírus, na diluição 1:10.000, em todas as concavidades das colunas 2, 5, 8 e 11.
- 100 µl de anticorpo monoclonal específico para o grupo A na diluição 1:10.000, em todas as concavidades das colunas 3, 6, 9 e 12.

A microplaca foi incubada por 2 horas a 37° C e após esse tempo lavada conforme descrito na 1ª fase.

4ª FASE: Adição do conjugado.

Foram adicionados 100 µl de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído a 1:1.000 em PBS/T/BSA, em todas as concavidades da microplaca e esta foi incubada por 1 hora a 37° C. Em seguida, a placa foi lavada conforme a 1ª fase.

5ª FASE: Adição do substrato.

O preparo do substrato para fosfatase alcalina foi realizado dissolvendo-se 2 tabletes de substrato (p-nitrofenil fosfato-5mg/cada) em 10 ml de tampão substrato (10% dietanolamina em água destilada e 0,1% azida sódica, pH 9,8), 10 minutos antes do uso, ficando esta solução com uma concentração final de 1 mg de p-nitrofenil-fosfato/ml. Foram adicionados 100 μ l do substrato em todas as concavidades da placa, que foi incubada a 37° C por aproximadamente 20 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 μ l de hidróxido de sódio (NaOH) 3 M, quando as concavidades correspondentes aos controles dos subgrupos I e II de rotavírus apresentaram uma coloração amarela. Após a leitura a placa foi imersa em solução de cloro 10%.

3.7.3. Leitura e Interpretação

A leitura da microplaca foi feita espectrofotometricamente, com filtro de absorbância de 405 nm.

As amostras foram consideradas como subgrupo I e/ou subgrupo II, quando a leitura de absorbância correspondente a um dos subgrupos apresentava-se 2 vezes maior que a leitura do outro.

ESQUEMA 1:

	SI	SII	G	SI	SII	G	SI	SII	G	SI	SII	G
concavidades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												

SI = anticorpo monoclonal específico subgrupo I de rotavírus

SII = anticorpo monoclonal específico subgrupo II de rotavírus

G = anticorpo monoclonal específico grupo A de rotavírus

A e B = concavidades em duplicata para amostra teste

Cada amostra foi testada em duplicata (veja esquema 1), sendo que na concavidade 1 foi colocada anticorpo monoclonal específico para o subgrupo I; na concavidade 2 o anticorpo específico para o subgrupo II e na concavidade 3 anticorpo específico para o grupo A de rotavírus.

Sendo assim, quando a amostra de rotavírus era classificada como do subgrupo I, observava-se a cor amarela nas concavidades 1 e 3, uma vez que o rotavírus pertencia também ao grupo A. Quando a amostra pertencia ao subgrupo II a leitura espectrofotométrica da concavidade 2 tinha que ser um valor pelo menos 2 vezes maior que a encontrada na concavidade 1 e a cor aparecia nas concavidades 2 e 3. Quando não ocorria a coloração amarela nas concavidades 1 e 2, mas era positiva na concavidade 3 as amostras não eram subgrupadas mas determinava-se que a amostra era pertencente ao grupo A de rotavírus.

3.8. Análise dos resultados

Foram consideradas como amostras positivas para rotavírus todas aquelas que foram positivas tanto no teste de EGPA como no teste de EIERA.

3.8.1. Cálculo estatístico

A análise estatística dos resultados obtidos foram realizados pelo Prof^o Ademir J. Petenate, do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação, Departamento de Estatística - UNICAMP - e os métodos empregados foram os seguintes:

3.8.1.1. Método da diferença entre proporções

Este método determina o nível de significância, isto é, através da diferença entre proporções procura-se demonstrar o nível de significância entre 2 valores, desde que seja menor do que um (1). Esse método foi utilizado para que pudéssemos comparar os resultados obtidos na detecção de rotavírus em EGPA e EIERA e também para estudos dos resultados encontrados nas amostras-caso e amostras-controle.

3.8.1.2. Método de Mantel-Haenszel

Este método é utilizado para calcular-se valores da estimativa, ou seja, quantas vezes mais um determinado evento pode ocorrer, em função de uma variável, em relação ao controle. No presente trabalho, este teste foi aplicado para se avaliar, em cada faixa etária, a relação rotavírus versus diarreia.

4. RESULTADOS

Com o objetivo de detectar a presença de rotavírus foram estudadas 1010 amostras de fezes de crianças sendo 505 com diarreia (crianças-caso) e 505 sem diarreia (crianças-controle). Todas as amostras coletadas foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus (EIERA). Do total de amostras analisadas, foram observados rotavírus em 75 amostras de fezes (7,4%) (Tabela 2). Analisando estes dados separadamente podemos observar que das 75 amostras positivas para rotavírus, 68 delas, isto é, 90,6% eram provenientes de crianças com um quadro de diarreia o que equivale, por outro lado, a 13,46% dos 505 casos de diarreia estudados. Nas 505 amostras-controle, somente em 7 delas foi detectada a presença de rotavírus o que corresponde a 9,33% do total de amostras positivas e somente 1,38% das amostras de crianças sem diarreia (Tabela 2). De acordo com o resultado obtido analisando-se estatisticamente a diferença entre proporção caso/controlado em relação à detecção de rotavírus, observou-se que, o valor encontrado, ou seja, zero (0) é altamente significativo.

Conforme mostra a Tabela 1, das 75 amostras rotavírus positivas, 50 foram detectadas tanto em EGPA como no EIERA. No teste de EGPA 68 amostras foram positivas, enquanto o EIERA detectou somente 57 amostras. Através do cálculo estatístico, a

diferença de positividade encontrada em EGPA e EIERA não foi significativa, pois o nível de significância foi de 15%.

Duas das 505 amostras analisadas foram positivas para adenovírus, mas não foram incluídas nos resultados, uma vez que este não era objetivo do nosso trabalho.

A faixa etária das crianças em estudo variou de 0 a 72 meses, conforme mostra a Tabela 3. Foram observados rotavírus em crianças até 60 meses de idade.

Nos estudos de casos, a maior incidência de eliminação de rotavírus ocorreu na faixa etária entre 13 a 24 meses de idade, onde em 31 crianças foi detectada a presença do vírus (Tabela 3), o que equivale a 18,12% das amostras analisadas nesta faixa etária e 6,13% do total de amostras-caso. Nas outras faixas etárias também foram detectados casos de rotavirose, com uma variação de 8,3% a 12,5% das amostras estudadas em cada faixa.

Com relação as amostras-controle, rotavírus foram detectados entre crianças de 13 a 60 meses de idade e, como pode ser notado na Tabela 3, em todas estas faixas etárias não houve uma variação significativa no número de crianças que eliminavam rotavírus nas fezes.

Durante os meses em que houve a coleta de fezes, tomou-se o cuidado de procurar obter a cada mês o mesmo número de amostra para crianças-caso e crianças-controle. Conforme pode ser visto na Tabela 4, foram coletadas amostras no período de abril de 1989 a março de 1990, perfazendo 12 meses de pesquisa, abrangendo assim as 4 estações do ano. De acordo com a Tabela 4 e

a Figura 1, podemos observar que em todos os meses estudados foi possível detectar rotavírus, porém a maior incidência ocorreu entre abril a julho de 1989, onde do total de 75 amostras positivas para rotavírus, 54 (72%) foram detectadas neste período. Destas 54 amostras, 50 (92,59%) foram detectadas em amostras-caso. Podemos observar que das 7 amostras-contrôle positivas para rotavírus, 4 (57,14%) foram observadas também neste período.

A distribuição mensal dos eletroferotipos está demonstrada na Tabela 5. Do total de 75 amostras identificadas como rotavírus positivo, de acordo com os testes de EGPA e EIERA (Tabela 1), apenas 59 amostras (78,66%) foram caracterizadas quanto ao perfil eletroforético, através da técnica de EGPA. Observando-se a migração dos segmentos de RNA dos rotavírus os mesmos foram classificados de acordo com o modelo proposto por Lourenço et alii (65), conforme mostra a Figura 2, com alguns eletroferotipos diferentes.

Durante o período de estudo foi possível definir 17 eletroferotipos diferentes, conforme mostra a Tabela 5, sendo 1 amostra caracterizada como perfil curto (Figura 3), onde foi observada na classe IV, a migração mais lenta do segmento 11 do RNA viral e também 2 amostras com perfil eletroferotipo diferente ao padrão do grupo A, sugerindo a sua classificação como pertencente ao grupo C de rotavírus (Figura 2).

A maioria dos perfis de migração apresentaram distribuição esporádica, embora 2 desses perfis tenham aparecido

com uma maior frequência, como mostra a Tabela 5.

De acordo com a Tabela 6, pode-se verificar o resultado obtido através do teste de Ensaio imunoenzimático (EIE) para a detecção de subgrupos I e/ou II de rotavírus do grupo A, com a utilização de anticorpos monoclonais específicos.

Neste teste, do total de 75 amostras positivas em EGPA e/ou EIERA, apenas 70 amostras foram analisadas com a utilização direta de suspensões fecais. As 5 amostras restantes não foram analisadas devido à quantidade insuficiente de amostra.

Dentre as amostras analisadas, 3 amostras (4,28%) apresentaram-se como pertencentes ao subgrupo I e 39 amostras (55,71%) com especificidade para subgrupo II. Na análise do perfil eletroforético por EGPA, apenas 1 das 3 amostras apresentou o subgrupo I e o padrão curto de migração, ou seja, com alteração na mobilidade do segmento 11 do RNA. Em 1 amostra de fezes (1,42%), pudemos observar reação tanto para o subgrupo I como para o subgrupo II. Esta mesma amostra, no entanto, em EGPA mostrou a presença de mais de 11 segmentos do RNA viral (Figura 2), sugerindo assim uma mistura de 2 rotavírus. Pelo resultado do EIE para subgrupo e dado o perfil observado em EGPA, podemos concluir que 1 dos rotavírus pertence ao subgrupo I e outro ao subgrupo II.

Dentro da Tabela 6, 13 amostras (18,57%) não foram possíveis de serem determinadas quanto à especificidades de subgrupos, mas apresentaram-se como pertencentes ao rotavírus do grupo A. Em 14 amostras (20%) que não foram subgrupadas nem no

subgrupo I nem subgrupo II, não foi possível, através deste teste sorológico determinar suas especificidade quanto ao grupo A. No entanto, essas amostras foram em EGPA e EIERA positivas para rotavírus do grupo A, com exceção de 2 delas (2,85%) que apresentaram perfil eletroforético sugestivo ao grupo C de rotavírus.

Tabela 1. Concordância entre os testes de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) e Ensaio Imunoenzimático (EIERA) para detecção de rotavírus em 1010 crianças de 0 a 72 meses de idade, na cidade de São Paulo.

=====				
EGPA				
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL

E	POSITIVO	50	07	57
I				
E				
R	NEGATIVO	18	935	953
A				
=====				
TOTAL		68	942	1010
=====				

Teste estatístico: Método da diferença entre proporções

Nível de significância: 15% (não significante)

Tabela 2. Número de amostras de fezes analisadas para crianças/caso e crianças/controle; número de amostras positivas para rotavírus e porcentagem de positividade.

Número de amostras analisadas		Amostras rotavírus positivo	
		NÚMERO	PORCENTAGEM
CASO	505	68	13,46
CONTROLE	505	07	1,38
TOTAL	1010	75	7,40

Teste estatístico: Método da diferença entre proporções

Nível de significância: 0 (altamente significante)

Tabela 3. Incidência de rotavírus em 1010 crianças, distribuídas de acordo com a faixa etária.

=====						
CASO			CONTROLE			

Faixa etária	nº rotavírus positivo/ nº crianças		nº rotavirus positivo/ nº crianças			
(meses)	estudadas	%	estudadas	%	Estimativa*	

0 - 12	02/ 22	9,10	0/ 16	0	0,909	
13 - 24	31/ 171	18,12	02/ 164	1,22	14,865	
25 - 36	19/ 152	12,50	03/ 160	1,87	6,667	
37 - 48	07/ 84	8,33	01/ 82	1,22	6,833	
49 - 60	09/ 72	12,50	01/ 76	1,31	9,500	
61 - 72	0/ 04	0	0/ 06	0	0	
73	0/ 0	0	0/ 01	0	0	
=====						
TOTAL	68/ 505	13,46	07/ 505	1,38	9,739	
=====						

* Método de Mantel-Haenszel

Tabela 4. Distribuição mensal dos casos de rotavírus encontrados em crianças-caso e crianças-controle, de 0 a 72 meses de idade, na cidade de São Paulo, S.P.

=====					
		CASO	CONTROLE		

ANO	MÊS	nº rotavírus positivo/ nº crianças estudadas	nº rotavírus positivo/ nº crianças estudadas	TOTAL	%

1989	Abril	12/ 45	0/ 45	12/ 90	13,33
	Maio	13/ 42	0/ 42	13/ 84	15,47
	Junho	10/ 38	02/ 38	12/ 76	15,78
	Julho	15/ 41	02/ 41	17/ 82	20,73
	Agosto	07/ 48	0/ 48	07/ 96	7,28
	Setembro	02/ 35	0/ 35	02/ 70	2,85
	Outubro	01/ 41	0/ 41	01/ 82	1,21
	Novembro	02/ 50	01/ 50	03/ 100	3,00
	Dezembro	01/ 39	0/ 39	01/ 78	1,28
1990	Janeiro	01/ 34	0/ 34	01/ 68	1,47
	Fevereiro	02/ 50	02/ 50	04/ 100	4,00
	Março	02/ 42	0/ 42	02/ 84	2,38
=====					
TOTAL		68/ 505	07/ 505	75/ 1010	7,42
=====					

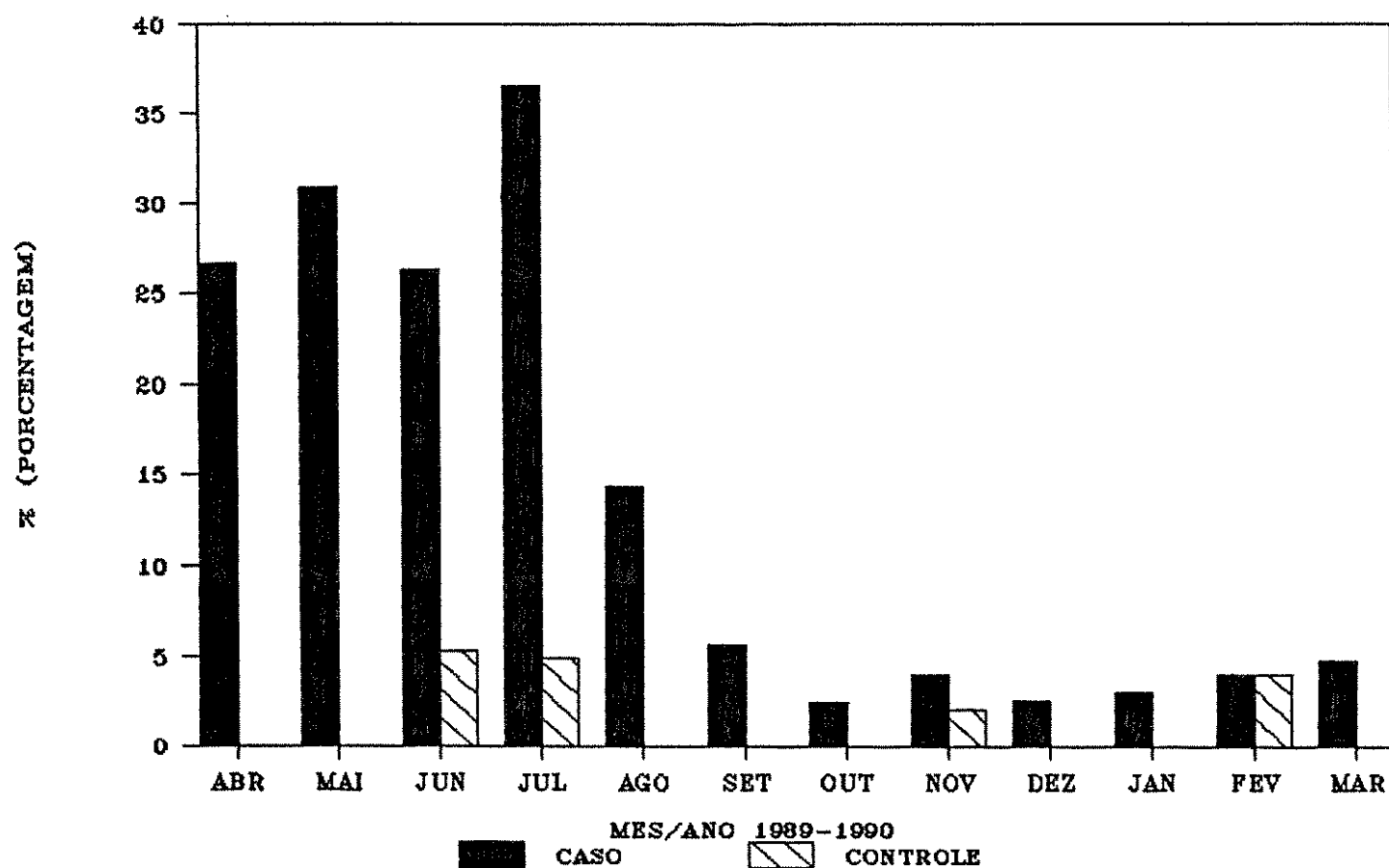


Figura 1. Porcentagem de positividade de rotavírus identificados em fezes de crianças-caso e crianças-controle, de 0 a 72 meses de idade no período de abril de 1989 a março de 1990, na cidade de São Paulo, S.P.

Tabela 5. Distribuição dos eletroferotipos de rotavírus identificados em EGPA em fezes de crianças de 0 a 72 meses de idade na cidade de São Paulo, durante o período de abril de 1989 a março de 1990

=====																	
ANO																	
1989										1990							

MESES DA COLETA																	
04 05 06 07 08 09 10 11 12 01 02 03 TOTAL																	

CLASSES I II III IV																	

GRUPO A	a	b	e	a	2										2		
	b	a	b	a	1										1		
	c	a	a	a		1									1		
	c	a	e	a				1							1		
	c	a	f	a					1						1		
	c	a	g	a	1										1		
	c	b	b	a			1			1					2		
	c	b	d	a								1			1		
	c	b	e	a			3	2				1			6		
	c	b	f	a	1						1				2		
	c	b	g	a							1				1		
	c	c	b	a		1		2							3		
	c	c	d	a		1	2		2						5		
	c	c	e	a		6	1	2							9		
	c	c	f	a	1	2	4	3	3	1					14		
	c	c	g	a	1			3					1	1	6		
c	b	d	b				1							1			
=====																	
GRUPO C*		--		1						1						2	
=====																	
* Provável grupo C, de acordo com Pedley et alii (82).																	

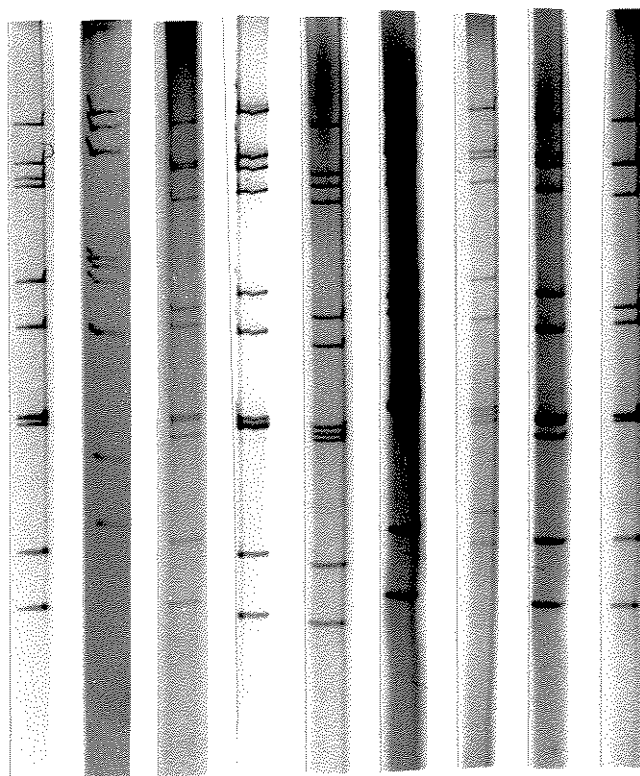


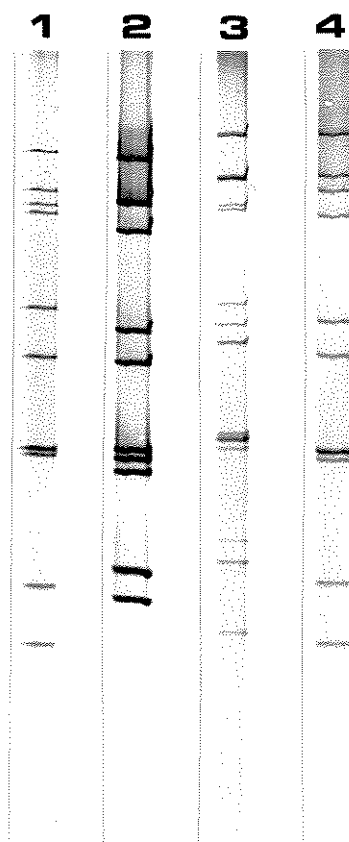
Figura 2. Alguns eletroferotipos de rotavírus detectados em Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em amostras de fezes de crianças com e sem diarreia, de 0 a 72 meses de idade, analisadas na cidade de São Paulo, no período de abril de 1989 a março de 1990.

Tabela 6. Resultados obtidos no teste de Ensaio Imunoenzimático (EIE) para determinação de subgrupos, nas amostras rotavírus positivas.

=====			
EIE	Grupo A	Subgrupo I	Subgrupo II

POSITIVO	03	03	0
	39	0	39
	01	01	01
	13	0	0

NEGATIVO	14	0	0
=====			
TOTAL	70	04	40
=====			



1- SA11

2- perfil curto

3- mistura de rotavírus

4- perfil longo

Figura 3. Perfis eletroforéticos de rotavírus com padrão longo, curto e mistura identificados pela eletroforese em gel de poliacrilamida, em fezes de crianças de 0 a 72 meses de idade, com e sem diarreia, na cidade de São Paulo.

5. DISCUSSÃO

Os rotavírus têm se destacado como um dos principais agentes etiológicos de origem não bacteriana causadores de diarreia em humanos e animais, em várias partes do mundo (31).

Esta infecção atinge principalmente crianças com idade inferior a 5 anos. Em países menos desenvolvidos está estimado que dentro dos episódios de diarreia ocorridos, 14% são considerados moderadamente severos ou severos, levando a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 0,7% ao ano, em contraste com os países desenvolvidos onde taxa é bastante baixa (0,015%), apesar da diarreia causada por rotavírus ocorrer com prevalência significativa (55).

Um dos principais objetivos de nossa pesquisa foi analisar a presença de rotavírus em crianças com e sem diarreia não internadas em hospitais, isto é, sob atendimento ambulatorial. As amostras de fezes foram coletadas no ambulatório do Hospital Menino Jesus, na cidade de São Paulo, no período de abril de 1989 a março de 1990, perfazendo um total de 1 ano de estudo.

Foram analisadas 1010 amostras, sendo 505 amostras coletadas de crianças que apresentavam diarreia e foram consideradas como amostras-caso e as outras 505 amostras de crianças sem diarreia, denominadas amostras-controle. Cada amostra controle foi coletada no mesmo dia da amostra-caso, de

crianças com idade aproximada.

A idade dessas crianças variou de 0 a 72 meses, sendo que apenas 1 das crianças ultrapassou esta faixa, mas também foi por nós incluída neste trabalho, mesmo sendo negativa em relação à presença de rotavírus. Essas crianças foram divididas em 7 grupos diferentes de acordo com a faixa etária, conforme mostra a Tabela 3.

Todas as amostras foram por nós analisadas pelo ensaio imunoenzimático (EIERA) para diagnóstico de rotavírus do grupo A e também pelo teste de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), uma vez que, este pode ser utilizado para estudos epidemiológicos (29). Foi considerada como positiva qualquer amostra cujo resultado tenha sido EGPA positivo e/ou EIERA positivo. Dentro do total de 1010 amostras estudadas foram identificadas 75 amostras positivas (7,4%) para rotavírus (Tabela 2). Observando-se em separado somente os resultados positivos para rotavírus obtidos em crianças-caso foram detectados 68 amostras de rotavírus representando 90,66% das amostras positivas. Nas crianças-controle somente 7 amostras ou 9,33% do total foram positivas. De acordo com o cálculo estatístico aplicado, ou seja, o método da diferença entre proporções, a relação presença de rotavírus versus diarreia apresentou uma diferença significativa, uma vez que o nível de significância obtido foi igual a zero (0). Diante destes resultados pode-se concluir que os rotavírus são efetivamente importantes na etiologia da diarreia infantil. Relatos anteriores em outros

países (44, 55), assim como no Brasil (63, 103) também têm demonstrado a relação liberação de rotavírus e presença de diarreia osmótica em crianças.

Conforme mostra a Tabela 1, no teste de EGPA foram identificadas 68 amostras positivas de rotavírus (90,66%), enquanto que o teste de EIERA detectou somente 57 amostras positivas (76%). Esses resultados coincidem com aqueles citados por Pereira et alii (84), que verificaram uma maior sensibilidade do EGPA em relação ao EIERA. Estes dados quando analisados estatisticamente, pelo método da diferença entre proporções, não demonstraram uma diferença significativa, com um nível de significância foi de 15%, podemos concluir que tanto a EGPA como a EIERA são testes equivalentes para a detecção de rotavírus. Por outro lado, podemos considerar que essa diferença se deva ao fato do teste de EGPA detectar os 11 segmentos do RNA de rotavírus independente do grupo a que ele pertença, isto é, tanto os rotavírus do grupo A como aqueles conhecidos como "atípicos" ou não pertencentes a este grupo sorológico. Como já citado anteriormente, o EIERA utilizado por nós é um teste sorológico capaz de detectar somente os rotavírus pertencentes ao grupo A. Sendo assim, todas as amostras com resultado positivo em EIERA e todas aquelas amostras que foram negativas neste teste, mas em EGPA mostraram um perfil eletroforético típico de rotavírus do grupo A foram considerados como pertencentes a este grupo sorológico (29).

uma vez que este tipo de diarreia ocorre subitamente.

Já em crianças com diarreia, onde não foi detectada a presença de rotavírus outros tipos de agentes, como a *E. coli* enterotoxigênica, EPEC e/ou *Shigella*, poderiam ser agentes causadores da doença.

Analisando os resultados obtidos de acordo com a faixa etária, verificamos que na faixa de 0 a 12 meses de idade, foram encontrados 9,1% de positividade nas crianças com diarreia (Tabela 3). Nesta mesma faixa etária, nas crianças sem diarreia, nenhuma amostra positiva para rotavírus foi detectada. Os fatores que poderiam levar a esta resistência aparentemente maior nos primeiros meses de vida à rotavirose podem estar alicerçados na imunidade passiva, uma vez que vários autores têm demonstrado em trabalhos realizados em animais jovens, um alto nível de anticorpos circulantes para rotavírus, derivados do colostro e também adquiridos por via transplacentária (45, 123). Em se tratando do papel desempenhado por anticorpos sistêmicos ou coproanticorpos produzidos por infecções naturais, Offit et alii (80), sugerem, após observações experimentais em animais, que o anticorpo presente no lúmen do intestino delgado seria, provavelmente, o maior fator determinante dessa imunidade ao rotavírus, concluindo que o anticorpo adquirido passivamente não conferia proteção no mesmo nível que a aquela induzida por infecções naturais. Mesmo com muitos trabalhos relatados sobre a influência do aleitamento materno e a proteção contra diarreia por rotavírus, vários autores têm argumentado que esses dados não

permitem ainda conclusões definitivas (34, 37, 87).

Ainda em relação à Tabela 3, a faixa etária que apresentou um maior índice de positividade para rotavírus foi aquela que compreende crianças de 13 a 24 meses de idade, onde foram detectadas 18,12% das amostras positivas, o que difere significativamente do valor encontrado nas crianças sem diarreia, onde o índice de positividade ficou em 1,22%. De acordo com o cálculo estatístico pelo método de Mantel-Haenszel, com qual se calculou a estimativa de se encontrar amostras positivas para rotavírus em crianças com diarreia em relação às crianças sem diarreia, foi encontrado um valor de 14,865 nesta faixa etária. Isto significa que em fezes de crianças com diarreia nesta faixa etária, a possibilidade de detecção de rotavírus é 14,865 vezes maior do que em crianças sem diarreia. Já na faixa de 25 a 36 meses de idade, crianças com diarreia apresentaram 12,50% de positividade e em crianças sem diarreia este índice foi de 1,87%. Estatisticamente, o valor estimado entre as duas proporções foi de 6,667. Na faixa etária de 37 a 48 meses de idade o percentual de positividade diminuiu para 8,33% para crianças com diarreia, enquanto que para as crianças sem diarreia este valor foi de 1,22%; sendo 6,833 o valor estimado para as duas proporções. Isto poderia significar que em crianças acima de 24 meses de idade, a ocorrência de diarreia por rotavírus seria ocasional, apesar de ainda ser mais significativa a presença deste agente em crianças com diarreia. Foi observado a presença de rotavírus em crianças até 5 anos, ou seja, na faixa de 49 a 60 meses de idade e, nesta

faixa o valor aumentou tanto para crianças com diarreia (12,50%), como sem diarreia (1,31%) e estatisticamente o valor estimativo foi de 9,739. Nas crianças com faixa etária acima de 61 meses de idade, não foi encontrada nenhuma amostra positiva para rotavírus.

De modo geral, podemos perceber que a porcentagem de positividade para rotavírus foi sempre maior em crianças com diarreia do que em crianças sem diarreia (Tabela 3). Calculando-se a diferença de proporções para toda a população estudada as crianças com diarreia apresentaram 9,739 mais a presença de rotavírus que as crianças sem diarreia.

Esses resultados apresentados coincidem com aqueles já relatados anteriormente por Kapikian et alii (55), que através de uma extrapolação mundial, chegou a valores anuais sugestivos para os casos de gastroenterites por rotavírus em várias faixas etárias em crianças de : 0 a 11 meses seriam 410.000 os casos de diarreia por este vírus; este número subiria para 1.474.000 casos em crianças entre 12 a 23 meses; na faixa etária entre 24 a 35 meses teríamos 475.000 casos e na faixa de 36 a 60 meses 573.000 casos. Como pode ser observado, nossos resultados são semelhantes aos valores sugeridos por estes autores, com relação à presença de diarreia em crianças nas diferentes faixas etárias. No entanto, estes mesmos autores sugerem que o aumento no número de casos na faixa etária de 49 a 60 meses de idade seria principalmente em decorrência de infecções assintomáticas. No presente trabalho não foi possível confirmar este resultado.

Entre 72 amostras provenientes de crianças com diarreia, 9 (12,5%) foram positivas para rotavírus, enquanto que em 76 crianças-controle apenas 1 (1,31%) estava eliminando rotavírus.

Na Tabela 4 e Figura 1, podemos observar a distribuição mensal da incidência de rotavírus no período de abril de 1989 a março de 1990. A quantidade de amostras analisadas mensalmente não apresentou variação significativa e, nos primeiros 4 meses de estudo, ou seja, de abril a julho, considerados como meses mais frios, foi encontrada uma maior incidência de rotavírus com um pico no mês de julho (20,73%), considerado como o mês mais frio do ano (Figura 1). Nesses meses iniciais foram analisadas 332 amostras de fezes de crianças com e sem diarreia, o que equivale a 32,87% do total de 1010 amostras analisadas durante o período de estudo e, o total de amostras positivas foi de 54 (72%). Levando-se em conta o total de 75 amostras positivas em todas as amostras analisadas, o restante de 28%, ficam distribuídos nos 8 meses subsequentes. Das 54 amostras positivas para rotavírus encontradas nos 4 primeiros meses de estudo, 50 amostras (92,59%) foram detectadas em crianças-caso e 4 (57,10%) em crianças-controle.

Conforme relatos da literatura, a rotavirose em alguns países apresenta uma distribuição sazonal com uma maior frequência de isolamento de rotavírus nos períodos mais frios do ano (29). Nossos resultados vêm, no entanto, confirmar o que dizem outros autores, isto é, que em países de clima tropical a incidência da rotavirose, embora seja maior nos meses mais frios

do ano, continua sendo considerada endêmica durante todo o ano (43, 68) (Figura 1).

Em países de clima tropical e em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, podemos tentar explicar estes resultados da seguinte forma: ocorreria uma maior frequência de rotavirose em crianças nos períodos mais frios do ano dada a maior capacidade de sobrevivência do vírus em temperaturas mais baixas e em baixa umidade relativa (3). Por outro lado, o isolamento e caracterização destes vírus nos outros períodos do ano seria decorrente do fato de, nestes países, a população, na sua maioria, não ter acesso a água de boa qualidade. Como a água é a principal fonte de contaminação de rotavírus, que por sua vez é bastante resistente aos métodos empregados para o tratamento da água e esgotos, a possibilidade de contato com o vírus é relativamente alta durante todos os meses do ano.

Na tentativa de classificação e observação dos perfis eletroforéticos de rotavírus em EGPA, foi por nós adotada a classificação proposta por Lourenço et alii (65). Esta classificação se baseia na divisão dos 11 segmentos de RNAs em 4 classes, onde a classe I contém os 4 primeiros segmentos de maior peso molecular, a classe II os segmentos 5 e 6, a classe III os segmentos 7, 8 e 9 e a classe IV os segmentos 10 e 11, com menor peso molecular. Pequenas variações na migração dos vários segmentos do material genômico dos rotavírus, equivale a um perfil eletroforético. Sendo assim, dentro das 75 amostras positivas para rotavírus em EGPA e EIERA (Tabela 1), foi possível

a classificação de acordo com este modelo, de 59 dessas amostras (Tabela 5). Foram detectados 17 eletroferotipos diferentes e alguns destes eletroferotipos estão demonstrados na Figura 2. A distribuição destes eletroferotipos de acordo com a coleta mensal de fezes foi muito variável. A maioria dos eletroferótipos apareceu distribuída de maneira não uniforme nos diferentes meses da coleta, sendo que 2 desses perfis apareceram com maior frequência (c,c,e,a e c,c,f,a) e em meses consecutivos. Dentro do total de 59 amostras analisadas através dos eletroferotipos, 57 amostras apresentaram um perfil condizente com o grupo A de rotavírus e 2 apresentaram um perfil compatível com o grupo C de rotavírus. Nestas, pode-se observar a ausência da tríade do agrupamento da classe III do grupo A, ou seja, dos segmentos 7, 8 e 9 e também uma diferença relacionada à classe II (Figura 2 - linha 2). Em 1 amostra, foram visualizados 14 segmentos do RNA viral e podemos concluir tratar-se de uma mistura de vírus (Figura 3 - linha 4). Uma amostra com o padrão curto foi observado, através da mobilidade lenta do segmento 11, da classe IV (Figura 3 - linha 2).

A grande diversidade de perfis eletroforéticos encontrados por nós está de acordo com muitos trabalhos realizados em outros países (23, 105, 107). No Brasil, Pereira et alii (86), também encontraram uma grande heterogeneidade desses perfis, analisando amostras de 3 estados brasileiros. Esses dados vêm provar a evidência da diversidade dos rotavírus humanos. A heterogeneidade dos rotavírus prevalentes numa população sugere

alterações progressivas no genoma viral "in vivo" (26).

Um outro objetivo do presente trabalho foi a determinação dos subgrupos dos rotavírus por nós identificados. Para tal, foi realizado um teste imunoenzimático, já que não é possível uma correlação direta entre o perfil eletroforético e o subgrupo dos rotavírus (20, 46).

Sabe-se que os antígenos de subgrupo estão localizados na proteína VP6 do capsídeo interno, codificada pelo 6º segmento genômico e que este possui 2 especificidades distintas, ou seja, para o subgrupo I e para o subgrupo II (60).

A técnica por nós utilizada para distinguir o subgrupo dos rotavírus do grupo A, foi o ensaio imunoenzimático para subgrupo, que utiliza anticorpo monoclonal específico preparado contra antígenos dos subgrupo I e II.

Do total das 70 amostras testadas, conforme mostra a Tabela 6, 3 amostras (4,28%) apresentaram especificidade para o subgrupo I, 39 amostras (55,71%) para o subgrupo II, (que é mais comumente encontrado (49)), 1 amostra (1,42%) para ambos os subgrupos e 13 amostras (18,57%) não foram identificadas quanto ao subgrupo. Estas porém, demonstraram especificidade para o grupo A de rotavírus e quando analisadas em EIERA, este resultado demonstra portanto, que a proteína VP6 está presente no vírus e a não determinação dos subgrupos, poderia ser explicada por: 1) ter ocorrido uma perda parcial do epítipo responsável pela subgrupagem do vírus; 2) estes vírus possuíam epítopos diferentes dos já conhecidos, como tem ocorrido em outros estudos

(62, 115) e portanto, pertenceriam a um outro subgrupo, diferente daqueles que nós analisamos. Em relação às 14 amostras que não apresentaram especificidade aos subgrupos I e II e também ao grupo A de rotavírus, provavelmente tenham perdido totalmente a proteína VP6, devido às condições de estocagem. O fato de encontrarmos uma frequência maior de rotavírus do grupo A, subgrupo II (55,71% das amostras analisadas) é coincidente com outros dados da literatura (4, 77, 101) que mostram que a grande maioria dos rotavírus humanos identificados em várias partes do mundo, pertencentes a este subgrupo.

Observando ainda o perfil eletroforético das amostras em EGPA foi possível observar que em 59 delas (76,66%), 56 apresentaram o padrão longo de migração eletroforética, 1 amostra o padrão curto e 2 amostras demonstraram um perfil sugestivo do grupo C de rotavírus (Figura 2). Das 3 amostras com especificidade para o subgrupo I, 2 amostras apresentaram padrão longo de migração (Figura 3 - linha 3) e apenas 1 amostra o padrão curto (Figura 3 - linha 2), o que vem confirmar resultados obtidos por outros autores que mostram a não relação entre o perfil eletroforético e subgrupos de rotavírus (36, 116).

Para finalizar, os nossos resultados sugerem ou demonstram que a rotavirose é, certamente uma causa importante da diarreia em crianças, principalmente na faixa etária de 13 a 24 meses de idade, podendo ocorrer com menor frequência em outras idades. Tanto quanto saibamos, nenhum outro estudo amplo, envolvendo um número elevado de crianças-caso e crianças-

controle, em diferentes faixas etárias havia sido realizado em nosso meio. Também, pela 1ª vez em nosso país, os subgrupos de rotavírus foram determinados. Diante destes resultados podemos concluir:

7. CONCLUSÕES:

1 - Com relação às técnicas empregadas para a detecção de rotavírus em fezes de crianças, ou seja, o Ensaio Imunoenzimático (EIERA) e a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), podemos dizer que os 2 testes, podem ser utilizados para a detecção de rotavírus em extratos fecais. Dado o alto grau de concordância entre os testes de EGPA e EIERA, qualquer um dos 2 testes pode ser utilizado como o objetivo acima exposto. Apesar do teste de EGPA ter detectado 68 amostras positivas de rotavírus e o teste de EIERA apenas 57 amostras e o teste estatístico da diferença entre proporções mostrou um nível de significância de 15%, o que é considerado como não significativo.

2 - No presente trabalho ficou evidenciada a participação do rotavírus como agente de diarreia em crianças. Das 505 amostras de fezes provenientes de crianças com diarreia, 68 amostras (13,46%) foram positivas para rotavírus. Das 505 amostras de fezes não-diarreicas, em apenas 7 amostras (1,38%) foi

diagnosticada a presença do vírus. Este resultado, quando analisado estatisticamente pelo método da diferença entre proporções mostrou um nível de significância igual a zero (0), o que é altamente significativo. Pelo método de Mantel-Haenszel, também ficou evidenciado este aspecto, uma vez que o valor estimado para a identificação de rotavírus em fezes de crianças com diarreia foi de 9,739 vezes maior que o em fezes de crianças sem diarreia.

3 - Analisando a incidência de rotavírus com relação à faixa etária das crianças em estudo, podemos concluir que:

a) Nos primeiros meses de vida, isto é, entre 0 a 12 meses, a probabilidade de crianças apresentarem diarreia por rotavírus foi bastante pequena.

b) A maior incidência ocorreu em crianças entre 13 a 24 meses de idade, onde 31 amostras foram positivas para rotavírus em crianças-caso e 2 amostras foram positivas em crianças-controle. Isto significa 44% do total de amostras positivas de rotavírus, no presente trabalho.

c) Em crianças entre 25 a 60 meses de idade a incidência de rotavírus foi significativamente menor.

Analisando estatisticamente os resultados obtidos dentro de cada faixa etária através do método de Mantel-Haenszel, pudemos observar que em crianças até 12 meses de idade a possibilidade de detecção de rotavírus em fezes diarreicas é 0,909 maior que a em fezes não diarreicas. Já na faixa etária entre 13 a 24 meses de

vida este valor foi de 14,865, mostrando portanto a importância deste agente na diarreia de crianças nesta faixa etária.

4 - Com relação à distribuição mensal dos casos de rotavírus, pudemos concluir que nos meses mais frios do ano (abril a julho) a incidência de rotavírus foi maior que nos outros meses em estudo. Das 75 amostras positivas para rotavírus, nas 1010 amostras de fezes de crianças analisadas, 54 amostras (72%) foram detectadas neste período.

5 - Através do teste de EIE para determinação de subgrupos dos rotavírus foi possível verificar a maior incidência do subgrupo II num total de 39 amostras (55,71%), enquanto que, para o subgrupo I apenas 3 amostras (4,28%) foram identificadas. Em uma 1 amostra (1,42%), onde foram detectados mais de um rotavírus em EGPA, encontrou-se especificidade para o subgrupo I e para o subgrupo II.

6 - Observando-se a migração dos segmentos de RNA em EGPA e o teste de EIE para subgrupo, foi possível verificar a não correlação entre o perfil eletroforético e subgrupo, uma vez que encontramos 2 amostras pertencentes ao subgrupo I com padrão longo de migração eletroforética.

7 - No presente estudo foram detectadas 2 amostras não pertencentes ao grupo A de rotavírus, com o teste de EIERA negativo e perfil eletroforético sugestivo de rotavírus do grupo C.

8 - Através do modelo proposto por Lourenço et alii (65), foram identificados 17 eletroferotipos diferentes de rotavírus em EGPA, distribuídos de forma não uniforme nos diferentes meses em que foram coletadas as amostras para estudo.

8. RESUMO

Os rotavírus são uma das principais causas de diarreia em crianças menores que 5 anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a taxa de mortalidade tem se mostrado bastante alta. A infecção por rotavírus é auto-limitada, leva à descamação rápida e intensa do epitélio colunar das vilosidades do intestino delgado e acarreta o encurtamento e atrofia das vilosidades intestinais a nível do intestino delgado. Consequentemente, há um prejuízo no processo de absorção-digestão advindo uma diarreia do tipo osmótica por má-absorção, que persiste até a reposição do epitélio colunar das vilosidades.

Os rotavírus estão classificados como um gênero separado na família Reoviridae sendo compostos por 2 capsídeos (interno e externo) e 11 segmentos de RNA(ds). Os rotavírus são encontrados no homem e em várias espécies animais sendo morfológica, bioquímica e antigenicamente similares, por apresentarem antígenos de grupo comuns, associados ao capsídeo interno. Antígenos tipo-específicos estão ligados ao capsídeo externo.

No nosso trabalho foram analisadas 1010 amostras de fezes de crianças, sob atendimento ambulatorial na cidade de São Paulo, sendo que 505 destas apresentavam diarreia no momento da coleta e 505 eram provenientes de crianças sem diarreia. Para cada amostra de fezes com diarreia foi coletada no mesmo dia uma

outra amostra de criança sem diarreia para servir como controle.

Todas as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e em ensaio imunoenzimático (EIERA). Em EGPA foram detectadas 68 amostras positivas para rotavírus enquanto que, através do EIERA, foram detectadas 57 amostras positivas.

Do total de 75 amostras positivas para rotavírus, 68 amostras (13,46%) foram identificadas em crianças com diarreia e 7 amostras (1,38%) em crianças sem diarreia e em 59 amostras foi possível classificar 17 perfis eletroforéticos diferentes.

A maior frequência de rotavírus ocorreu em crianças na faixa etária de 13 a 24 meses de idade e foi durante os meses mais frios do ano (abril a julho de 1989) que houve uma maior incidência da doença.

Para melhor caracterização sorológica, as amostras foram testadas em um ensaio imunoenzimático (EIE) para a determinação do subgrupo a que pertenciam. Das 70 amostras analisadas, 3 amostras (4,28%) foram detectadas como pertencentes ao subgrupo I, sendo 2 delas com o padrão de migração longo de acordo com o EGPA, 39 amostras (55,17%) ao subgrupo II, 1 amostra (1,42%) com especificidade aos subgrupos I e II. Esta em EGPA demonstrou a presença de 2 rotavírus diferentes. Em 13 amostras (18,57%) não foi possível a classificação dentro dos subgrupos mas estas apresentaram resultado positivo para rotavírus do grupo A. As 14 amostras restantes não foram classificadas nem dentro dos subgrupos e nem mesmo quanto ao grupo A de rotavírus, apesar

de terem sido positivas em EGPA e/ou EIERA, com exceção de 2 amostras, que de acordo com perfil eletroforético, apresentaram um perfil sugestivo do grupo C de rotavírus.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ADAMS, W.R. & KRAFT, L.M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* 141:359-360, 1963.
- 2- ALBERT, M.J.; UNICOMB, L.E. & BISHOP, R.E. Cultivation and characterization of human rotaviruses with "super short" RNA patterns. *J. Clin. Microbiol.*; 25:183-185, 1987.
- 3- ANSARI, S.A.; SPRNGTHORPE, V.S. & SYED, S.A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: Possible relation to seasonality of outbreaks. *Reviews of Infections Diseases* 13:448-461, 1991.
- 4- ARISTA, S.; GIOVANNELLI, L.; PASSARINI, N.; TITONE, L. & GERNA, G. Electropherotyping of human rotaviruses: an epidemiological survey of rotavirus infections in Sicily. *Eur. J. Epidemiol.*; 2:104-107, 1986.
- 5- BEARDS, G.M. Serotyping of rotavirus by NADP-enhanced enzyme-immunoassay. *J. Virol. Meth.* 18:77-85, 1987.
- 6- BEARDS, G.M. & BROWN, D.W.G. The antigenic diversity of rotaviruses. *Eur. J. Epidemiol.* 4:1-11, 1988.
- 7- BIRCH, C.J.; HEATH, R.L. & GUST, I.D. Use of serotype-specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. *J. Med. Virol.*; 24:45-53, 1988.

- 8- 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. *Lancet* 2:1281-1283, 1973.
- 9- BOHL,E.H. Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 174:613-615, 1979.
- 10- BOHL,E.H.; SAIF,L.J.; THEIL,K.W.; AGNES,A.G.& CROSS,R.F. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic piglets. *J. Clin. Microbiol.*; 15: 312-319, 1982.
- 11- BOYLE,J.F. & HOLMES,K.V. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.*; 58:561-568, 1986.
- 12- BRANDT,C.D.; KIM,H.W.; RODRIGUEZ,W.J.; THOMAS,L.; YOLKEN,R. H.; ARROBIO,J.O.; KAPIKIAN,A.Z.; PARROT,R.H. & CHANOCK,R.M. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.*; 13:976-981, 1981.
- 13- BRIDGER,J.C. Detection by electron microscopy of calicivirus, astrovirus and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Vet. Rec.*; 107:532-533, 1980.
- 14- BRIDGER,J.C.; CLARKE,I.N. & McCRAE,M.A. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. *Infect Immun.*; 35: 1058-1062, 1982.

- 15- BRIDGER, J.C. & OLDHAM, G. Avirulent rotavirus infections protect calves from disease with or without inducing high levels of neutralizing antibody. *J. Gen. Virol.*, 68: 2311-2317, 1987.
- 16- BROWN, D.W.; BEARDS, G.M.; CHEN, G.M. & FLEWETT, T.H. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.*, 25:316-319, 1987.
- 17- BROWN, D.W., CAMPBELL, L. & BRIDGER, J.C. A school outbreak of gastroenteritis due to an atypical rotavirus. *Abstr. VIIIth. Int. Congr. Virol.*, P71-011, p.434, 1990.
- 18- CAUL, E.O.; ASHLEY, C.R.; DARVILLE, J.M. & BRIDGER, J.C. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J. Med. Virol.*, 30:201-205, 1990.
- 19- CHANOCK, S.J.; WENSKE, E.A. & FIELDS, B.N. Human rotaviruses and genome RNA. *J. Infect. Dis.*, 148:49-50, 1983.
- 20- CLARK, S.M.; HOSHINO, Y. & BELL, L.M. Rotavirus isolate W16 representing a presumptive new serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 25:1757-1762, 1987.
- 21- CLARK, S.M.; ROTH, J.R.; CLARK, M.L.; BARNETT, B. & SPENDLOVE, R.S. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanisms of enhancement. *J. Virol.*, 39:816-822, 1981.
- 22- COULSON, B.S.; TURSI, J.M.; McADAM, W.J. & BISHOP, R.F. Derivation of neutralizing monoclonal antibodies to human rotaviruses and evidence that an immunodominant neutralization site is shared between serotypes 1 and 3. *Virology* 30:302-312, 1986.

- 23- COULSON,B.S.; UNICOMB,L.E.; PITSON,C.A. & BISHOP,R.F. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*; 25:509-515, 1987.
- 24- CUKOR,G. & BLACKLOW,N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.*; 48:157-179, 1984.
- 25- DeLAGE,G.; McLAUGHLIN,B. & BERTHIAUME,L. A clinical study of rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr.*; 93:455-457, 1978.
- 26- DESSELBERGER,U. Molecular epidemiology of rotaviruses. *Immun. Infect.*; 16:182-188, 1988.
- 27- DYALL-SMITH,M.L. & HOLMES,I.H. Gene-coding assignments of rotavirus double-stranded RNA segments 10 and 11. *J. Virol.*; 38:1099-1103, 1981.
- 28- ESTES,M.K. & COHEN,J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*; 53:440-449, 1989.
- 29- ESTES,M.K.; GRAHAM,D.Y. & DIMITROV,D. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.*; 29:1-24, 1984.
- 30- ESTES,M.K.; GRAHAM,D.Y. & MASON,B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanism. *J. Virol.*; 39:879-888, 1981.
- 31- ESTES,M.K.; PALMER,E.L. & OBIJESKI,J.F. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 105:123-184, 1983.

- 32- FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S. & DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497, 1973.
- 33- FLORES, J.; PURCELL, R.H.; PEREZ, I.; WYATT, R.G.; BOEGGMAN, E.; SERENO, M.; WHITE, L.; CHANOCK, R.M. & KAPIKIAN, A.Z. A dot hybridization assay for detection of rotavirus. *Lancet* 1:555-559, 1983.
- 34- FORMAN, M.R.; GRANBARD, B.I.; HOFFMAN, H.J.; BEREN, R.; HARLEY, E. & BENNETT, P. The Pima infant feeding study: breast feeding and gastroenteritis in the first year of life. *Am. J. Epidemiol.*; 119:335-355, 1984.
- 35- GATTI, M.S.V.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; de CAMARGO, I.J.B. & HARA, N.H. Incidência de rotavírus em suínos na região de Campinas, S.P. *Rev. Microb.*; 19(3):327-332, 1988.
- 36- GHOSH, S.K. & NAIK, T.N. Detection of a large number of subgroup 1 human rotaviruses with a "long" RNA electropherotype. *Arch. Virol.*; 105:119-127, 1989.
- 37- GLASS, R.I.; STOLL, B.J.; WYATT, R.G.; HOSHINO, Y.; BANU, H. & KAPIKIAN, A.Z. Observations questioning a protection role for breast-feeding in severe rotavirus diarrhea. *Acta Paediatr. Scand.*; 75:713-718, 1986.
- 38- GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B. & FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*; 2:276:282, 1990.

- 39- GREENBERG, H.B.; FLORES, J.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G. & JONES, R.
Gene coding assignments for growth restriction,
neutralization and subgroup specificities of the Wa and
DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.*,
64:313-320, 1983.
- 40- GUERRANT, R.L.; KIRCHOFF, L.V.; SCHIELDS, D.S.; NATIONS, M.K.;
LESLIE, J.; de SOUZA, M.A.; ARAUJO, J.G.; CORREIA, L.L.; SAUER,
K.T. & McCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal
illnesses in Northeastern Brazil: patterns of disease,
nutritional impact, etiologies, and risk factors. *J.
Infect. Dis.*; 148:986-997, 1983.
- 41- HELMBERGER-JONES, M. & PATTON, J.T. Characterization of
subviral particles cells infected with simian rotavirus
SA11. *Virology*, 155:655-665, 1986.
- 42- 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.* 16:473-477, 1982.
- 43- HIEBER, J.P.; SHELTON, S.; NELSON, J.D.; LEON, J. & MOHS, E.
Comparison of human rotavirus disease in tropical and
temperate settings. *Am. J. Dis. Child.*; 132:853-858, 1978.
- 44- HOLMES, I.H. Rotaviruses. in Joklik W.K. ed. *The reoviridae*.
New York: Plenum Press; pp.359-423, 1983.
- 45- HOLMES, I.H.; RODGER, S.M. & SCHONAGL, R.D. Is Lactose
the receptor and uncoating enzyme for infantile enteritis
(rota) viruses? *Lancet* 1:1387-1389, 1976

- 46- HOSHINO, Y.; GORGOZIGLIA, M.; WALDESUSO, J.; ASKAA, J.; GLASS, R. I. & KAPIKIAN, A. Z. An equine rotavirus (FI-14 strain) wich bears both subgroup I and subgroup II specificities on its VP6. *Virology* 157:488-496, 1987.
- 47- HOSHINO, Y.; SERENO, M. M.; MIDTHUN, K.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. & CHANOCK, R. M. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 e VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:8701-8704, 1985.
- 48- HOSHINO, Y.; WYATT, R. G.; GREENBERG, H. B.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. Serotypic similarity and diversity of rotavirusses of mamalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J. Infect. Dis.*, 149:694-702, 1984.
- 49- HOULY, C. A.; UCHOA, M. M.; ZAIDAN, A. M.; GOMES-NETO, A.; OLIVEIRA, F. M. de; ATHYDE, M. A. G.; ALMEIDA, M. F. L. M. & PEREIRA, H. G. Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Maceió, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 19:33-37, 1983.
- 50- HUNG, T. Rotavirus and adult diarrhea. *Adv. Virus Res.*, 35:193-218, 1988.
- 51- KABCENEL, A. K.; PORUCHYNSKY, M. S.; BELLAMY, A. R.; GREENBERG, H. B. & ATKINSON, P. H. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J. Virol.*, 62:2929-2941, 1988.

- 52- KALICA, A.R.; GARON, C.F.; WYATT, R.G.; MEBUS, C.A.; VANKIRK, D.H.; CHANOCK, R.M. & KAPIKIAN, A.Z. Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Virology* 74:86-92, 1976.
- 53- KALICA, A.R.; GREENBERG, H.B.; ESPEJO, R.T.; FLORES, J.; WYATT, R.G.; KAPIKIAN, A.Z. & CHANOCK, R.M. Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect. Immun.*, 33:958-961, 1981.
- 54- KALICA, A.R.; SERENO, M.M.; WYATT, R.G.; MEBUS, C.A.; CHANOCK, R.M. & KAPIKIAN, A.Z. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of RNA. *Virology* 87:247-255, 1978.
- 55- KAPIKIAN, A.Z. & CHANOCK, R.M. Rotaviruses. in FIELDS, B.N., 2nd ed. *Virology*, Raven Press, New York; pp.1353-1404, 1990.
- 56- KAPIKIAN, A.Z.; CLINE, W.L.; GREENBERG, H.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R. BANKS, C.E.; JAMES, H.D. Jr.; FLORES, J. & CHANOCK, R.M. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immun.* 33:415-425, 1981.
- 57- KAPIKIAN, A.Z.; CLINE, W.L.; KIM, H.W.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; VANKIRK, D.H.; CHANOCK, R.M.; JAMES, H.D. Jr. & VAUGHN, A. L. Antigenic relationships among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of a new substitute CF antigen for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 152:535-539, 1976.

- 58- KAPIKIAN,A.Z.; WYATT,R.G. & LEVINE,M.M. Studies in volunteers with human rotaviruses. *Dev. Biol. Stand.*, 53:209-218, 1983.
- 59- KAPIKIAN,A.Z.; YOLKEN,R.H.; GREENBERG,H.B.; WYATT,R.G.; KALICA,A. R.; CHANOCK,R.M. & KIM,H.W. Gastroenteritis viruses. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections., 5th ed. LENNETT,H. & SCHMIDT,N. J.; eds. Washington,D.C. American Public Health Association, pp.927-995, 1979.
- 60- KOBAYASHI,N.; LINTANG,I.C.; URASAWA,T.; TANIGUCHI,K.; SANIEL, M.C.& URASAWA,S. Unusual human rotavirus strains having subgroup I specificity and "long" RNA electropherotype. *Arch. Virol.*, 109:11-23, 1989.
- 61-LAEMMLI,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- 62- LAMBERT,J.P.; MARISSSENS,D.; MARBEHANT,P. & ZISSIS,G. Prevalence of subgroup 1, 2, and 3 rotaviruses in Belgian children suffering from acute diarrhea (1978-1981). *J. Med. Virol.*, 11:31-38, 1983.
- 63- LINHARES,A.C.; PINHEIRO,F.P.; FREITAS,R.B.; GABBAY,Y.B.; SHIRLEY, J.A. & BEARDS,G.M. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune isolated South American Indian community. *Am. J. Epidemiol.*, 113:703-710, 1981.
- 64- LIU,M.; OFFIT,P.A. & ESTES,M.K. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32, 1988.

- 65- LOURENÇO, M.H.; NICOLAS, J.C.; COHEN, J.; SCHERRER, R. & BRICOUT, F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol.*; 132E:161-173, 1981.
- 66- MALHERBE, H.H.; HARWIN, R. & ULRICH, M. The cytopathic effect of varvet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.*; 37:407-411, 1963.
- 67- MASON, B.B.; GRAHAM, D.Y. & ESTES, M.K. In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.*; 33:1111-1121, 1980.
- 68- MATA, L.; SIMHON, A.; URRUTIA, J.J.; KRONMAL, R.A.; FERNANDEZ, R. & GARCIA, B. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J. Infect. Dis.*; 148:452-461, 1983.
- 69- MATSUI, S.M.; MACKOW, E.R. & GREENBERG, H.B. The molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.*; 36:181-214, 1989.
- 70- MATSUMOTO, K.; HATANO, M.; KOBAYASHI, K.; HASEGAWA, A.; YAMAZAKI, S.; NAKATA, S.; CHIBA, S. & KIMURA, Y. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in school children. *J. Infect. Dis.*; 160:611-615, 1989.
- 71- MATSUNO, S.; HASEGAWA, A.; MUKOYAMA, A. & INOUE, S. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.*; 54:623-624, 1985.

- 72- MEBUS,C.A.; KONO,M.; UNDERDAHL,N.R. & TWIEHAUS,M.J. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can. Vet. J.*, 12:69-72, 1971.
- 73- MEYER,J.C.; BERGMANN,C.C. & BELLAMY,A.R. Interaction of rotavirus cores with the nostructural glycoprotein NS28. *Virology* 171:98-107, 1989.
- 74- MITCHELL,D.B. & BOTH,G.M. Simian rotavirus SA11 segment 11 contains overlopping reading frames. *Nucleic Acids Res.*, 16:6244, 1988.
- 75- MURAKAMI,Y.; NISHIOKA,N.; HASHIGUCHI,Y. & KUNIYASU,C. Serotypes of bovine rotaviruses distinguished by serum neutralization. *Infect. Immun.*, 40:851-855, 1983.
- 76- NAGAYOSHI,S.; YAMAGUCHI,H.; ICHIKAWA,T.; MIYAZU,M.; MORISHIMA,T.; OZAKI,T.; ISOMURA,S.; SUZUKI,S. & HOSHINO,M. Changes of the rotavirus concentration in faeces during the course of acute gastroenteritis as determined by the immune adherence hemagglutination test. *Eur. J. Pediatr.*, 134:99-102, 1980.
- 77- NAKAGOMI,O.; NAKAGOMI,T.; OYAMADA,H. & SUTO,T. Relative frequency of human rotavirus subgroup 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, 17:29-34, 1985.
- 78- NAKATA,S.; ESTES,M.K.; GRAHAM,D.Y.; WANG,S.; GARY,G.W. & MELNICKS,J.L. Detection of antibody to group B adult diarrhea rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.*, 25:812-818, 1987.

- 79- NICOLAS, J.C.; COHEN, J.; PORTIER, B.; LOURENÇO, M.H. & BRICOUT, F. Isolation of a human pararotavirus. *Virology* 124:181-184, 1983.
- 80- OFFIT, P.A. & CLARK, H.F. Protection against rotavirus-induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastrointestinal but not circulating antibodies. *J. Virol.*, 54:58-64, 1985.
- 81- OFFIT, P.A.; CLARK, H.F.; BLAVAT, G. & GREENBERG, H.B. Reassortant rotaviruses containing structural protein VP3 e VP7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.*, 60:491-496, 1986.
- 82- PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; CHASEY, D. & McCRAE, M.A. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J. Gen. Virol.*, 67:131-137, 1986.
- 83- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P. & CASTRO, L.de. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Methods* 10:21-28, 1985.
- 84- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F. FARIAS, V. & de VIDAL, M.N.P. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 78(4):480-490, 1983

- 85- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. & TRABULSI, J.R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg.*, 90:117-125, 1983.
- 86- PETRIE, B.L.; GREENBERG, H.B.; GRAHAM, D.Y. & ESTES, M.K. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.*, 1:133-152, 1984.
- 87- RAHMAN, M.M.; YAMAUCHI, M.; HANADA, N.; NISHIKAWA, K. & MORISHIMA, T. Local production of rotavirus specific IgA in breast tissue and transfer to neonates. *Arch. Dis. Child.*, 62:401-405, 1987.
- 88- RODRIGUEZ, W.J.; KIM, H.W.; ARROBIO, J.O.; BRANDT, C.D.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G. & PARROT, R.H. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.*, 91:188-193, 1977.
- 89- ROHDE, J.E. & NORTHRUP, R.S. Taking science where the diarrhea is. in: Acute diarrhoea in childhood. Ciba Foundation Symposium. Amsterdam *Excerpta Medica* 42 (New series): 339-366, 1976.
- 90- SAIF, L.J.; ROSEN, B.I.; KONG, S. & MILLER, K.L. Cell culture propagation of rotaviruses. *J. Tiss. Cult. Meth.*, 11:147-156, 1988.
- 91- SAIF, L.J.; TERRET, L.A.; MILLER, K.L. & CROSS, R.F. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. *J. Clin. Microbiol.*, 26:1277-1282, 1988.

- 92- SAMMONS, O.W.; ADAMS, L.D. & MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver- base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2:135-141, 1981.
- 93- SAN JUAN, C.S.; BELLINZONI, R.C.; MATTION, N.; La TORRE, J. & SCONDELLER, E.A. Incidence of group A and atypical rotaviruses in brazilian pig herds. *Res. Vet. Sci.*; 41:270-272, 1986.
- 94- SCHMIDT, N.J. Cell culture procedures for diagnostic virology. in: SCHMIDT, N.J. & EMMONS, R.W. eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections* 6th ed. American Public Health. Association, Inc. Washington, D.C.; pp:51-100, 1989.
- 95- SHAW, R.D.; FONG, K.J.; LOSONSKY, G.A.; LEVINE, M.M.; MALDONADO, Y. YOLKEN, R.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A.Z.; VO, P.T. & GREENBERG, H. B. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology* 93:941-950, 1987.
- 96- SHAW, R.D.; MACKOW, E.R.; DYALL-SMITH, M.L.; LADZINS, I.; HOLMES, I.H. & GREENBERG, H.B. Serotypic analysis of VP3 and VP7 neutralization escape mutants of rhesus rotavirus. *J. Virol.*; 62:3509-3512, 1988.
- 97- SITBON, M.; LECERF, A.; GARIN, Y. & IVANOFF, B. Rotavirus prevalence and relationships with climatological factors in Gabon, Africa. *J. Med. Virol.*; 16:177-182, 1985.

- 98- SNODGRASS,D.R.; HERRING,A.J.; CAMPBELL,I.; INGLIS,J.M. & HARGREAVES,F.D. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J. Gen. Virol.*; 65:909-914, 1984.
- 99- SNYDER,J.D. & MERSON,M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal diseases: a review of active surveillance data. *Bull WHO* 60:605-613, 1982.
- 100- SPENCER, E.; AVEDANO,F. & ARAYA,M. Characteristics and analysis of electropherotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J. Infect. Dis.*; 148:41-48, 1983.
- 101- STEELE,A.D. & ALEXANDER,J.J. The relative frequency of subgroup I and II rotavirus in blacks infants in South Africa. *J. Med. Virol.*; 24:321-327, 1988.
- 102- STINTZING,G.; TUFVESON,B.; HABTE,D.; BACK,E.; JOHNSON,T. & WADSTROM,T. Aetiology of acute diarrhoeal disease in infancy and childhood during the peak season in Addis Ababa 1977: a preliminary report. *Ethiop Med. J.*; 15:141-146, 1977.
- 103- SUTMOLLER,F.; AZEREDO,R.S.; LACERDA,M.D.; BARTH,O.M.; PEREIRA H.G.; HOFFER,E. & SCHATZMAYR,H.G. An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavirus and *Shigella sonnei* in a private school in Rio de Janeiro. *Journal of Hygiene* 88:285-293, 1982.
- 104- SVENSSON,L.; GRAHNQUIST,L.; PETTERSSON,C.A.; GRANDIEN,M.; STINTZING,G. & GREENBERG,H.B. Detection of human rotaviruses wich do not react with subgroup I and II specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*; 26:1238-1240, 1988.

- 105- SZUCS,G.; KENDE,M. & UJ,M. Shift in genomic molecular patterns of human rotaviruses over an eighteen-month period in Hungary. *Intervirology* 28:110-113, 1987.
- 106- TALLET,S.; MACKENZIE,C; MIDDLETON,P.; KERZNER,B. & HAMILTON, R. Clinical laboratory and epidemiological features of viral gastroenteritis in infants and children. *Pediatrics* 60:217-222, 1977.
- 107- TAM,J.S.; ZHENG,B.; YAN,Y; Lo,S.K.; YEUNG,C.Y.; Lo,M. & Ng, M.H. Ocurrance of rotaviruses in Guangzhou and Hong Kong. *J. Infect. Dis.*; 157:357-363, 1988.
- 108- TANIGUCHI,K.; URASAWA,T.; KOBAYASHI,N.; GORZIGLIA,M.E. & URASAWA,S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J. Virol.*; 64:5640-5644, 1990.
- 109- TERRET,K.W. & SAIF,L.J. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in primary porcine kidney cell culture. *J. Clin. Microbiol.*; 25:1316-1319, 1987.
- 110- THEIL,K.W.; BOHL,E.H.; CROSS,R.F.; KOHLER,E.M. & AGNES, A.G. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.*; 39:213-220, 1978.
- 111- THEIL,K. & McCLOSKEY,C.M. Partial characterization of a bovine group A rotavirus with a short genome electropherotype. *J.Clin. Microbiol.*; 26:1094-1099, 1988.

- 112- THEIL, K.W.; REYNOLDS, D.L. & SAIF, Y.M. Comparison of immune electron microscopy and genome electrophoretotyping techniques for detection of turkey rotaviruses and rotavirus-like viruses in intestinal contents. *J. Clin. Microbiol.*, 23:695-699, 1986.
- 113- THEIL, K.W.; SAIF, L.J.; MOORHEAD, P.D. & WHITMOYER, R.E. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 21:340-345, 1985.
- 114- TRABULSI, R.L. Bacteriologia especial, em MICROBIOLOGIA, eds. L.R. TRABULSI; M.R.F. TOLEDO E N.P. dA SILVA. Rio de Janeiro. Livraria Ateneu, pp. 133-152, 1986.
- 115- TUFVESSON, B. Detection of a human rotavirus strain different from types 1 and 2 - a new subgroup? Epidemiology of subgroups in a Swedish and an Ethiopian community. *J. Med. Virol.*, 12:111-117, 1983.
- 116- URASAWA, S.; URASAWA, T.; WAKASUGI, N.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, I.; LINTAG, I.C.; SANIEL, M.C. & GOTO, H. Presumptive seventh serotype of human rotavirus. *Arch. Virol.*, 113:279-282, 1990.
- 117- VESIKARI, T.; SARKKINEN, H.K. & MAKI, M. Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood diarrhoea. *Acta Paediatr. Scand.*, 70:717-721, 1981.
- 118- VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassay with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* 31:507-520, 1978.

- 119- WALSH, J.A. & WARREN, K.S. Selective primary health care. An interim strategy for disease control in developing countries. *N. Engl. J. Med.*, 301:967-974, 1979.
- 120- WARD, R.L.; NAKAGOMI, O.; KNOWLTON, D.R.; McNEAL, M.M.; NAKAGOMI, T.; CLEMENS, J.D.; SACK, D.A. & SCHIFF, G.M. Evidence for natural reassortants of human rotavirus belonging to different genogroup. *J. Virol.*, 64:3219-3225, 1990.
- 121- W.H.O. Mortality due to diarrheal diseases in the world. *WHO Weekly Epidemiol. Rec.*, 48:409-416, 1973.
- 122- W.H.O. Steering Committee of the Scientific Working Group on Viral Diarrhoeas. Nomenclature of human rotaviruses: designation of subgroups and serotypes. *Bull W.H.O.*, 62:501-503, 1984.
- 123- WOODE, G.N.; JONES, J. & BRIDGER, J. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 97:148-149, 1975.
- 124- WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C.; JONES, J.M.; FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H.A. & WHITE, G.B.B. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotavirus) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun.*, 14:804-810, 1976.
- 125- YOLKEN, R.H.; BARBOUR, B.A.; WYATT, R.G. & KAPIKIAN, A.Z. Immune responses to human rotaviral infection-measurement by enzyme immunoassay. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173:552-554, 1978.

8. APÊNDICE

I. Preparo de soluções utilizadas em EIERA e EIE

1. TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS) pH 7.4

NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ..12 H ₂ O.....	2,89 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O Destilada q.s.p.....	1000,0 ml

Conservar a 4° C.

2. PBS/T

TWEEN 20.....	0,5 ml
PBS(1) q.s.p.....	1000,0 ml

Conservar a 4° C.

3. BSA 10% (Albumina de Soro Bovino - Fração V)

BSA.....	10,0 g
PBS(1) q.s.p.....	100,0 ml

Conservar a -20° C.

4. PBS/T/BSA

BSA 10%.....10,0 ml

PBS/T(2).....90,0 ml

Conservar a -20° C.

5. PBS/T/BSA/EDTA

EDTA 0,25 (pH ajustado a 7.4 com Tris).. 2,0 ml

PBS/T/BSA(3).....48,0 ml

Conservar a -20° C.

6. TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO pH 9.6

 Na_2CO_340,0 ml Na_3HCO_385,0 ml H_2O destilada.....375,0 ml

Conservar a 4° C.

7. SUBSTRATO (Suficiente para uma placa) pH 5.6

Ácido cítrico 0,1M.....6,1 ml

 Na_2HPO_4 0,2M.....6,4 ml H_2O destilada.....12,5 ml

OPD (orto-fenilenodiamina).....10,0 mg

 H_2O_2 (30vol).....37,5 ul

II. Preparo de soluções utilizadas em EGPA.

8. FENOL BIDEUTILADO

- Redestilar o fenol, evitando-se a primeira e última partes
- Congelar a -20°C
- Aquecer a 70°C
- Medir o volume de fenol e um igual volume de clorofórmio
- Introduzir o fenol sobre o clorofórmio, sem deixar tocar nas paredes laterais
- Homogenizar
- Verter em frasco escuro e saturar com H_2O destilada
- Separar as fases e manter a solução a -20°C .

9. SOLUÇÃO A: ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA

Acrilamida.....50,0 g
N-N-Bis-Metileno Acrilamida.....1,3 g
 H_2O destilada, completar a100,0 ml

10. SOLUÇÃO B: TAMPÃO PARA GEL INFERIOR (1,5M Tris/HCl pH 8.8)

Tris Hidroximetil aminometano.....18,17 g
 H_2O destilada, completar a100,0 ml
HCl 12N suficiente para acertar o pH a 8.8

11. SOLUÇÃO C: TAMPÃO PARA GEL SUPERIOR (0,5M Tris/HCl pH 6.8)

Tris Hidroximetil aminometano.....6,0 g
H₂O destilada, completar a100,0 ml
HCl 12N suficiente para acertar o pH a 6.8

12. SOLUÇÃO D: PERSULFATO DE AMÔNIO A 2%

(Solução preparada no momento de uso)

Persulfato de amônio.....40,0 mg
H₂O destilada.....2,0 ml

13. SOLUÇÃO E: TAMPÃO PARA OS RESERVATÓRIOS - 4 X CONCENTRADO)

Tris hidroximetil aminometano.....12,0 g
Glicina.....57,6 g
H₂O destilada, completar a1000,0 ml

14. MISTURA DISSOCIANTE (1 X)

Uréia.....3,0 g
2-Mercaptoetanol.....0,5 ml
SDS a 10% em água destilada.....3,0 ml
Tris/HCl 0,5M, pH 6.8 (solução C).....1,25 ml
Azul de bromofenol a 1%.....0,1 ml
H₂O destilada completar a10,0 ml

initials

Questionário para estudo da doença diarreica - CASO

Definição do caso:

(marque cada um) --- idade 12 a 59 meses

--- diarreia (≥ 3 evacuações de fezes não formadas ou aquosas/dia)

--- por ≤ 7 dias, e ≥ 14 dias desde último episódio de diarreia

--- nunca foi entrevistado neste estudo

Número do registro do Hospital Menino Jesus: _____

Pessoa entrevistada: 1 _____ mãe 2 _____ outra, quem cuida da criança
3 _____ outra, especificar

A. INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS

1. Código nº: _ _ _ _ Nome _____

2. Data do nascimento: / /
 dia mês ano

3. Sexo: 1 masculino 2 feminino

4. Distrito: _____

Código do Sub-distrito: _____

B. INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1. Data desta visita: / /
 dia mês ano

2. Data do início da diarreia: dia / mês / ano

3. Nos últimos 7 dias, a criança apresentou:

	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
a. vômitos	_____	_____	_____
b. sangue nas fezes (anote o que a mãe disse, não o que você viu)	_____	_____	_____
c. febre (anote a opinião da mãe)	_____	_____	_____
d. coriza ou congestão nasal	_____	_____	_____
e. tosse	_____	_____	_____
f. dor de garganta	_____	_____	_____
g. choro ou dor abdominal quando evacua	_____	_____	_____

4. Número mais elevado de evacuações em 24 horas (um dia e uma noite)
nos últimos 7 dias: (*nota, se < 3, não é um caso de diarreia)

- 1 3-5
2 6-9
3 10-14
4 > 15
5 Desconhecido

5. Grau de desidratação:

- 1 hidratada
2 leve
3 moderada
4 grave
5 desconhecido

	LEVE	MODERADA	GRAVE
Geral	irritado	mais agitada	largada
Sede	sim	extrema	não aparente
Boca	seca	muito seca	lábios cianosados
Pele	elasticidade ↓	elasticidade ↓↓	fria
Olhos	brilhantes	afundados	muito afundados
Fontanela	normal	deprimida	deprimida
Tono		aumentado	flacidez
Ritmo cardíaco	130-140	160-180	180
Respiração		rápida e suspirada	lenta e superficial
Diurese	↓	↓↓	↓↓↓

6. Peso: , kg (somente anotar os resultados obtidos no
Temp. axilar: , C hospital hoje)
Altura: cm

C. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

1. A criança passou a noite em um hospital nos 30 dias anteriores ao início da diarreia?

 Sim Não Desc

SE NÃO, VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 2 (página 3)

SE SIM, interrogue sobre a internação mais recente:

a. Nome do hospital da internação mais recente:

Código do hospital:

b. Motivo da internação: 1 Diarreia
2 Outros:
3 Desconhecido especificar

c. Quantos dias ficou no hospital?

d. Quantos dias após a alta hospitalar esta diarreia teve início?
 (*nota, 00 = início em um hospital)

e. Qual o número de outras crianças internadas no mesmo quarto no hospital?

f. Durante a hospitalização, a criança foi submetida a:

(1) sonda nasogástrica: ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

(2) uma cirurgia: ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE SIM a cirurgia, descreva: _____

2. a. A criança recebeu algum antimicrobiano para esta diarreia?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

b. A criança recebeu algum antimicrobiano nos 14 dias anteriores ao início da diarreia?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

Nome de todos os antimicrobianos recebidos nos 14 dias anteriores ao início da diarreia ou após o início da diarreia. (Se o nome for desconhecido, anotar como nome desconhecido e responder todas as ou tras perguntas)

Nome do antimicrobiano	VIA I=IV ou IM V=V.O A=Ambos D=Desc	Data do início (dia/mes/ano)	Data do interrompido (dia/mes/ano)	Motivo para o início do antibiotico	
				1 Esta Diarreia	2 Outra
				☐	☐
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____

3. Nos 7 dias anteriores ao início desta diarreia, a criança foi cuidada em sua própria casa durante o dia $\geq$ 4 dias?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

4. Nos 7 dias anteriores ao início desta diarreia, a criança foi cuidada durante o dia em:

a. Na creche? ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

b. Na escola? ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

c. Em outra casa com crianças de outras casas? ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

d. Outra situação fora de casa? ☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

_____ especificar

SE NÃO EM TODAS AS ACIMA, VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 5 (página 5)

SE SIM, em creches, escolas ou outras casas, quantos lugares (no total, além de sua casa) a criança foi cuidada nos 7 dias anteriores ao início desta diarreia?

a. Diga-me o nome da creche ou da pessoa da casa onde a criança recebeu a maior parte do cuidado nos 7 dias anteriores ao início desta diarreia?

(1) Nos 7 dias anteriores ao início desta diarreia, durante quantos dias recebeu cuidados neste lugar?

(2) Que tipo de lugar é este?

- [illegible]

(3) Distrito do lugar? _____

Código do Sub-distrito: _____

(4) Quanto tempo atrás em relação a hoje, a criança começou a
frequentá-la?

- | | | |
|---|-------|--------------|
| 1 | _____ | < 1 mês |
| 2 | _____ | 1-2 meses |
| 3 | _____ | 3-6 meses |
| 4 | _____ | 7-12 meses |
| 5 | _____ | > 1 ano |
| 6 | _____ | desconhecido |

(5) Quantas crianças há na classe?

- | | | | |
|---|-------|---|--------------|
| 1 | 1-4 | 5 | 50-99 |
| 2 | 5-9 | 6 | 100-199 |
| 3 | 10-19 | 7 | ≥ 200 |
| 4 | 20-49 | 8 | desconhecido |

SE A CRIANÇA FOI CUIDADA SOMENTE EM UM LUGAR (EXCETO SUA PRÓPRIA CASA) VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 5 (página 5)

b. Se a criança foi cuidada em mais de um lugar fora de casa, além dos lugares da pergunta anterior, nome do segundo lugar onde a criança esteve a maior parte do tempo:

(1) Nos 7 dias anteriores ao início desta diarréia, durante quantos dias recebeu cuidados neste lugar?

(2) Que tipo de lugar é este?

- 1 — creche
2 — escola
3 — outra casa com crianças de outras casas
4 — outra situação _____
 especificar
5 desconhecido

(3) Distrito do lugar?

Código do Sub-distrito: _____

(4) Quanto tempo atrás em relação a hoje, a criança começou a frequentá-la?

- 1 ☐ < 1 mês
2 ☐ 1-2 meses
3 ☐ 3-6 meses
4 ☐ 7-12 meses
5 ☐ > 1 ano
6 ☐ desconhecido

(5) Quantas crianças há na classe?

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1 ☐ 1-4 | 5 ☐ 50-99 |
| 2 ☐ 5-9 | 6 ☐ 100-199 |
| 3 ☐ 10-19 | 7 ☐ ≥ 200 |
| 4 ☐ 20-49 | 8 ☐ desconhecido |

5. A criança estava recebendo qualquer quantidade de leite materno nos 7 dias anteriores ao início da diarreia?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE NÃO, com que idade a criança parou de ser amamentada ao seio?
☐ ☐ meses (*nota 00=nunca foi amamentada, 99= desconhecido)

6. Nos 7 dias anteriores ao início da diarreia, a criança recebeu algum alimento na mamadeira, em casa ou em outro local?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE NÃO, OU DESCONHECIDO, VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 7 (página 6)

SE SIM,

a. Algumas vezes quando você prepara a mamadeira para o seu bebê ele não acaba todo o conteúdo. O que você geralmente faz quando o bebê não toma todo o conteúdo da mamadeira?

- 1 ☐ joga fora o resto
2 ☐ guarda para mais tarde
3 ☐ outra, explique: _____
4 ☐ desconhecido

b. Queremos saber algumas coisas sobre a limpeza de partes da mamadeira.

(1) Após usar a mamadeira, como você geralmente limpa o bico da mamadeira?

	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
Lava com água	☐	☐	☐
Lava com sabão	☐	☐	☐
Ferve o bico	☐	☐	☐
Outra, explique:	_____		

(2) Após usar a mamadeira, como você limpa a mamadeira? (além do bico)?

	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
Lava com água	☐	☐	☐
Lava com sabão	☐	☐	☐
Ferve a mamadeira	☐	☐	☐
Outra, explique:	_____		

7. Eu vou nomear algumas bebidas. Diga-me, por favor, nos 7 dias anteriores ao início da diarreia, a criança ingeriu quais dos seguintes alimentos líquidos:

SE SIM, bebeu de uma mama
deira ou outra vasilha,
ou ambos:

Bebida	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>	<u>Mamadeira</u>	<u>Outra</u>	<u>Ambos</u>
<u>Leite de vaca</u>	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>SE SIM, que tipo de</u> <u>Leite de vaca (A, B,</u> <u>C, outro, desc)</u>	_____					
<u>Leite em pó</u>	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Suco feito em casa</u>	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Água não fervida</u>	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Água fervida ou chá</u>	_____	_____	_____	_____	_____	_____

8. A criança usa chupeta?

_____ Sim _____ Não Desc

9. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia ingerido, nos 7 dias anteriores ao início da diarreia?

____ Sim ____ Não Desc

SE SIM, nome do(s) alimento(s): _____

10. Estas perguntas são sobre a preparação da comida. Queremos saber como você prepara os seguintes alimentos? (*nota código de onde guarda: 1=armario ou prateleira ou sobre o fogão, 2=fogão, 3=gela deira, 4=outra, 5=desc)

[illegible]

D. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS - FAMÍLIA

Agora eu preciso fazer algumas perguntas sobre as outras pessoas da sua casa.

1. Quantas pessoas dormem na casa?

Em quantos cômodos elas dormem?

Quantas outras pessoas dormem na mesma cama junto com esta criança?

SE MAIS DE 10 PESSOAS DORMIREM NA CASA, VÁ PARA A QUESTÃO 3

2. Você precisa me dizer qual a idade de todas as pessoas da sua casa, exceto esta criança:

No.	Idade	Sexo		Alguma dessas pessoas teve <u>diarreia</u> nas duas semanas que precederam o início da <u>diarreia</u> nesta criança			Prepara ou ajuda a <u>preparar a comida</u>		
	(ano/mês)	M	F	Sim	Não	Desc	Sim	Não	Desc
(1)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(2)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(3)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(4)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(5)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(6)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(7)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(8)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
(9)	<u> </u> <u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>

3. Assim, há outras crianças com menos de 5 anos na sua casa, correto? (Deve concordar com os dados acima, se preenchidos).

SE NÃO HOUVER (0) OUTRA CRIANÇA COM MENOS DE 5 ANOS, VÁ A PARTE E, INFORMAÇÕES EPI-CASA.

a. Há alguma criança < 5 anos na casa além deste paciente, que recebeu cuidados fora do lar nos 7 dias anteriores ao início da diarreia do paciente?

 Sim Não Desc

b. Há alguma criança com menos de 5 anos na casa, além deste paciente, que usa fraldas durante o dia?

 Sim Não Desc

c. Há alguma criança com menos de 5 anos na casa, além deste paciente, que usa fraldas enquanto dorme?

 Sim Não Desc

E. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS - CASA

1. Na casa da criança é utilizada água encanada da rede pública para
beber?

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

SE NÃO, coloque o nome da fonte de água

2. Quando esta criança bebe água, a água vem diretamente da torneira ou de algum outro local? (marque somente uma alternativa):

- 1 _____ diretamente da torneira
2 _____ de vasilha com água não fervida
3 _____ de vasilha com água fervida
4 _____ do filtro com água não fervida
5 _____ do filtro com água fervida
6 _____ outro, especificar: _____
7 _____ desconhecido

Se de vasilha ou filtro, eles são tampados habitualmente ou não?

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

- 3. Há uma torneira dentro da própria casa da criança?**

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

SE SIM, quantas torneiras? (*nota 99=desc)

4. Há na casa da criança um vasilhame (ou vasilha) para estocar a
água de beber?

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

SE SIM, as pessoas colocam o copo diretamente no vasilhame para pe-
gar a água?

	Sim	Não	Desc
1. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da comunidade.	10	10	10
2. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da sociedade.	10	10	10
3. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do indivíduo.	10	10	10
4. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da família.	10	10	10
5. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do país.	10	10	10
6. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do mundo.	10	10	10
7. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da humanidade.	10	10	10
8. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da civilização.	10	10	10
9. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura.	10	10	10
10. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da religião.	10	10	10
11. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da moral.	10	10	10
12. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da justiça.	10	10	10
13. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da paz.	10	10	10
14. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da liberdade.	10	10	10
15. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da igualdade.	10	10	10
16. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da fraternidade.	10	10	10
17. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da harmonia.	10	10	10
18. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da beleza.	10	10	10
19. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da verdade.	10	10	10
20. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da sabedoria.	10	10	10
21. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da ciência.	10	10	10
22. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da arte.	10	10	10
23. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da literatura.	10	10	10
24. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da música.	10	10	10
25. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da dança.	10	10	10
26. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do teatro.	10	10	10
27. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do cinema.	10	10	10
28. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da televisão.	10	10	10
29. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da internet.	10	10	10
30. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da tecnologia.	10	10	10
31. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da indústria.	10	10	10
32. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência do comércio.	10	10	10
33. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da agricultura.	10	10	10
34. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da pecuária.	10	10	10
35. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da pesca.	10	10	10
36. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da mineração.	10	10	10
37. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da construção civil.	10	10	10
38. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da saúde.	10	10	10
39. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da educação.	10	10	10
40. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura popular.	10	10	10
41. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura erudita.	10	10	10
42. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura tradicional.	10	10	10
43. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura contemporânea.	10	10	10
44. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura global.	10	10	10
45. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura local.	10	10	10
46. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura regional.	10	10	10
47. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura nacional.	10	10	10
48. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura internacional.	10	10	10
49. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura mundial.	10	10	10
50. O uso de drogas é necessário para a sobrevivência da cultura universal.	10	10	10

- 5. Estas perguntas são sobre o sanitário.**

- a. Onde é o sanitário da família?

- 1 _____ dentro da casa
2 _____ fora
3 _____ ambos
4 _____ não há sanitário
5 _____ outro, descreva:
6 _____ desconhecido

- b. O sanitário é usado por outras famílias?

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

- c. Há água corrente dentro do sanitário?

	Sim	Não	Desc
--	-----	-----	------

- d. Você vê água servida saindo do seu sanitário, a céu aberto per
to de sua casa?

Sim	Não	Desc
-----	-----	------

e. Que tipo de esgoto há na sua casa?

- 1 ☐ rede pública ou fossa
- 2 ☐ céu aberto
- 3 ☐ outros, descreva: _____
- 4 ☐ desconhecido

6. Há uma torneira para lavar as mãos dentro ou muito perto do sanitário?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE SIM, há sabonete para lavar as mãos, hoje?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

7. Qual o tipo de papel disponível para higiene, no sanitário, hoje?

- 1 ☐ papel higienico comercializado
- 2 ☐ nenhum
- 3 ☐ outros, especificar: _____
- 4 ☐ desconhecido

(RESPONDER SOMENTE SE A PESSOA ENTREVISTADA FOR A MÃE OU QUEM CUIDA DA CRIANÇA).

8. Muitas pessoas não entendem como é difícil cuidar de uma criança pequena, preparar a comida e cuidar da casa. Frequentemente não ha tempo para fazer tudo isto. Vou fazer algumas perguntas sobre algumas coisas que a mãe muito ocupada, pode não ter tempo de fazer. Você me dirá se faz algumas vezes estas coisas ou sempre, habitualmente, ou nunca:

1.Sempre 2.Habit. 3.Às vezes 4.Nunca 5.Desc

a. Quando uma criança pequena evacua e voce a limpa, voce lava suas maos apos?

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

b. Antes de preparar os alimentos voce lava as maos?

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

c. Após você usar o sanitario voce lava as suas maos?

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

d. Antes de você usar o sanitario, voce lava as suas maos?

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

9. Há na casa da criança um refrigerador funcionando hoje?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

10. Há na casa da criança algum animal?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE SIM:

<u>Animal</u>	<u>Há na casa</u>			<u>Entra na casa</u>		
	Sim	Não	Desc	Sim	Não	Desc
cachorro	___	___	___	___	___	___
gato	___	___	___	___	___	___
galinhas	___	___	___	___	___	___
<u>outro</u>	___	___	___	___	___	___

F. OUTROS DADOS

1. Até que ano da escola o chefe da família da criança cursou?

- | | | | |
|--------|---|-------|-------------------|
| 1 ___ | Nenhum | 3 ___ | Primário Completo |
| 2 ___ | Primário Incompleto | 5 ___ | Ginásial Completo |
| 4 ___ | Ginásial Incompleto | 7 ___ | Colegial Completo |
| 6 ___ | Colegial Incompleto | | |
| 8 ___ | Post-colegial (universidade, ou profissional) | | |
| 9 ___ | Outro, explique: _____ | | |
| 10 ___ | Desconhece | | |

2. Qual é aproximadamente a renda total mensal na casa (em salários mínimos)? ___ ___ ___ salários (*nota 999=desc)

(Hoje, aproximadamente, um salário mínimo vale ___ ___ ___ dólares)

G. INFORMAÇÕES SOBRE A AMOSTRA DE FEZES

1. Como foi obtido o "swab"?

- | | |
|-------|--|
| 1 ___ | "swab" inserido no reto |
| 2 ___ | "swab" de evacuação natural |
| 3 ___ | "swab" de evacuação com supositório de glicerina |
| 4 ___ | outros, ou combinação dos acima, descreva: _____ |

2. Aspecto das fezes?

- | | |
|-------|--------------|
| 1 ___ | sem sangue |
| 2 ___ | com sangue |
| 3 ___ | desconhecido |

H. INFORMAÇÃO FINAL

1. A criança passou a noite no hospital na data deste atendimento?

___ Sim ___ Não ___ Desc

SE SIM, destino da criança:

- | | |
|-------|--|
| 1 ___ | ficou somente no Pronto Socorro |
| 2 ___ | foi admitida em outras enfermarias do Hospital Infantil Menino Jesus |
| 3 ___ | foi encaminhada para outro hospital |

Motivo(s) da internação: _____

2. Nome do controle: _____

G. INFORMAÇÕES SOBRE A AMOSTRA DE FEZES

1. Com foi obtido o "swab"?

- 1 ☐ "swab" inserido no reto
- 2 ☐ "swab" de evacuação natural
- 3 ☐ "swab" de evacuação com supositório de glicerina
- 4 ☐ outros, ou combinação dos acima, descreva: _____

2. Aspecto das fezes?

- 1 ☐ sem sangue
- 2 ☐ com sangue
- 3 ☐ desconhecido

H. INFORMAÇÃO FINAL

1. A criança passou a noite no hospital na data deste atendimento?
☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE SIM, destino da criança:

- 1 ☐ ficou somente no Pronto Socorro
- 2 ☐ foi admitida em outras enfermarias do Hospital Infantil Menino Jesus
- 3 ☐ foi encaminhada para outro hospital

Motivo(s) da internação: _____

2. Nome do caso: _____

Quem fez a entrevista

INITIAIS

Definição do controle:

- parear com o caso pela idade no início da doença (12-23 meses, 24-35 meses, 36-59 meses)
- não ter diarreia, dor abdominal, vômitos, ou outros problemas gastrintestinais nos 30 dias anteriores ao início desta doença
- a duração do atual problema $\leq$ 7 dias
- diagnóstico final não ser febre de causa desconhecida
- nunca foi entrevistado neste estudo

Número do registro do Hospital Menino Jesus: _____

Pessoa entrevistada: 1 _____ mãe 2 _____ outra, quem cuida da criança
3 _____ outra, especificar

A. INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS

1. Código nº: _____ Nome _____
2. Data do nascimento: ____/dia____/mês____/ano_____
3. Sexo: 1 ____ masculino 2 ____ feminino
4. Distrito: _____
- Código do Sub-distrito: _____

B. INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1. Data desta visita: dia / mês / ano
2. Data do início da doença: dia / mês / ano
3. Nos últimos 7 dias, a criança apresentou:

a. febre (anote a opinião da mãe)

b. coriza ou congestão nasal

c. tosse

d. dor de garganta

<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

4. Peso: ____ , ____ kg (somente anotar os resultados obtidos no hospital hoje)

Temp. axilar: , C

Altura: _____ cm

5. Diagnóstico do controle: _____

C. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

1. A criança passou a noite em um hospital nos 30 dias anteriores ao início da doença?

_____ Sim _____ Não Desc.

SE NÃO, VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 2

SE SIM, interrogue sobre a internação mais recente:

- a. Nome do hospital da internação mais recente:

Código do hospital: _____

- b. Motivo da internação: 1 Diarréia
2 Outros: _____ especificar _____
3 Desconhecido

- c. Quantos dias ficou no hospital? _ _ _
- d. Quantos dias após a alta hospitalar esta doença teve início?
_ _ _ (*nota, 00 = início em um hospital)
- e. Qual o número de outras crianças internadas no mesmo quarto no hospital? _ _ _
- f. Durante a hospitalização, a criança foi submetida a:

- (1) sonda nasogástrica: Sim Não Desc
- (2) uma cirurgia: Sim Não Desc

SE SIM a cirurgia, descreva:

2. a. A criança recebeu algum antimicrobiano para esta doença?
 ___ Sim ___ Não ___ Desc
- b. A criança recebeu algum antimicrobiano nos 14 dias anteriores
 ao início da doença?
 ___ Sim ___ Não ___ Desc

Nome de todos os antimicrobianos recebidos nos 14 dias anteriores ao início da doença ou após o início da doença. (Se o nome for desconhecido, anotar como nome desconhecido e responder todas as outras perguntas).

VIA

Nome do antimicrobiano	I=IV ou IM V=V.O A=ambos D=desc	Data do início (dia/mes/ano)	Data do interrompido (dia/mes/ano)	Motivo para o início do antibiotico	
				1 Esta Doença	2 Outra
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____
_____	_____	____/____/____	____/____/____	_____	_____

3. Nos 7 dias anteriores ao início desta doença, a criança foi cuidada na própria casa durante o dia por 4 dias ou mais?

___ Sim ___ Não ___ Desc

4. Nos 7 dias anteriores ao início desta doença, a criança foi cuidada durante o dia em:

a. Na creche? ___ Sim ___ Não ___ Desc

b. Na escola? ___ Sim ___ Não ___ Desc

c. Em outra casa com
crianças de outras casas? ___ Sim ___ Não ___ Desc

d. Outra situação fora de casa? ___ Sim ___ Não ___ Desc

_____ especificar

SE NÃO EM TODAS AS ACIMA, VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 5 (página 4)

SE SIM, em creches, escolas ou outras casas, quantos lugares (no total, além de sua casa) a criança foi cuidada nos 7 dias anteriores ao início desta doença? ___

a. Diga-me o nome da creche ou da pessoa da casa onde a criança recebeu a maior parte do cuidado nos 7 dias anteriores ao início desta doença? _____

(1) Nos 7 dias anteriores ao início desta doença, durante quantos dias recebeu cuidados neste lugar? ___

(2) Que tipo de lugar é este?

1 ___ creche

2 ___ escola

3 ___ outra casa com crianças de outras casas

4 ___ outra situação _____ especificar

5 ___ desconhecido

(3) Distrito do lugar? _____

Código do Sub-distrito: ___

(4) Quanto tempo atrás em relação a hoje, a criança começou a frequentá-la?

1 ___ <1 mês

2 ___ 1-2 meses

3 ___ 3-6 meses

4 ___ 7-12 meses

5 ___ >1 ano

6 ___ Desconhecido

(5) Quantas crianças há na classe?

1 ___ 1-4

2 ___ 5-9

3 ___ 10-19

4 ___ 10-49

5 ___ 50-99

6 ___ 100-199

7 ___ >200

8 ___ Desconhecido

SE A CRIANÇA FOI CUIDADA SOMENTE EM UM LUGAR (EXCETO SUA PRÓPRIA CASA) VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 5.

b. Se a criança foi cuidada em mais de um lugar fora de casa, além dos lugares da pergunta anterior, nome do segundo lugar onde a criança esteve a maior parte do tempo: _____

(1) Nos 7 dias anteriores ao início desta doença, durante quantos dias recebeu cuidados neste lugar? ____

(2) Que tipo de lugar é este?

- 1 ____ creche
- 2 ____ escola
- 3 ____ outra casa com crianças de outras casas
- 4 ____ outra situação _____ especificar
- 5 ____ desconhecido

(3) Distrito do lugar? _____

Código do Sub-distrito: ____

(4) Quanto tempo atrás em relação a hoje, a criança começou a frequentá-la?

- 1 ____ < 1 mês
- 2 ____ 1-2 meses
- 3 ____ 3-6 meses
- 4 ____ 7-12 meses
- 5 ____ > 1 ano
- 6 ____ Desconhecido

(5) Quantas crianças há na classe?

- | | |
|--------------|---------------------|
| 1 ____ 1-4 | 5 ____ 50-99 |
| 2 ____ 5-9 | 6 ____ 100-199 |
| 3 ____ 10-19 | 7 ____ ≥ 200 |
| 4 ____ 20-49 | 8 ____ Desconhecido |

5. A criança estava recebendo qualquer quantidade de leite materno nos 7 dias anteriores ao início da doença?

____ Sim ____ Não ____ Desc

SE NÃO, com que idade a criança parou de ser amamentada ao seio?
____ meses (*nota 00=nunca foi amamentada, 99=desconhecido)

6. Nos 7 dias anteriores ao início da doença, a criança recebeu algum alimento na mamadeira, em casa ou em outro local?

____ Sim ____ Não ____ Desc

SE NÃO, OU DESCONHECIDO VÁ DIRETAMENTE A QUESTÃO 7 (página 5)

SE SIM,

a. Algumas vezes quando você prepara a mamadeira para o seu bebê ele não acaba todo o conteúdo. O que você geralmente faz quando o bebê não toma todo o conteúdo da mamadeira?

- 1 ____ joga fora o resto
- 2 ____ guarda para mais tarde
- 3 ____ outra, explique: _____
- 4 ____ Desconhecido

3. Assim, há outras crianças com menos de 5 anos na sua casa, correto? (Deve concordar com os dados acima, se preenchidos).

SE NÃO HOUVER (O) OUTRA CRIANÇA COM MENOS DE 5 ANOS, VÁ A PARTE E,
INFORMAÇÕES EPI-CASA.

- a. Há alguma criança < 5 anos na casa além deste paciente, que recebeu cuidados fora do lar nos 7 dias anteriores ao início da doença do paciente?

_____ Sim _____ Não _____ Desc

- b. Há alguma criança com menos de 5 anos na casa, além deste pacien
te, que usa fraldas durante o dia?

_____ Sim _____ Não _____ Desc

- c. Há alguma criança com menos de 5 anos na casa, além deste pacien
te, que usa fraldas enquanto dorme?

_____ Sim _____ Não _____ Desc

E. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS - CASA

1. Na casa da criança é utilizada água encanada da rede pública para beber?

_____ Sim _____ Não _____ Desc

SE NÃO, coloque o nome da fonte de água _____

2. Quando esta criança bebe água, a água vem diretamente da torneira ou de algum outro local? (marque somente uma alternativa):

- 1 _____ diretamente da torneira
2 _____ de vasilha com água não fervida
3 _____ de vasilha com água fervida
4 _____ do filtro com água não fervida
5 _____ do filtro com água fervida
6 _____ outro, especificar: _____
7 _____ desconhecido

Se de vasilha ou filtro, eles são tampados habitualmente ou não?

_____ Sim _____ Não _____ Desc

3. Há uma torneira dentro da própria casa da criança?

_____ Sim _____ Não Desc

SE SIM, quantas torneiras? _____ (*nota 99=desc)

4. Há na casa da criança um vasilhame (ou vasilha) para estocar a
água de beber?

_____ Sim _____ Não Desc

SE SIM, as pessoas colocam o copo diretamente no vasilhame para pe
gar a água?

_____ Sim _____ Não Desc.

b. Queremos saber algumas coisas sobre a limpeza de partes da ma
madeira.

(1) Após usar a mamadeira, como você geralmente limpa o bico da
mamadeira?

	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
Lava com água	___	___	___
Lava com sabão	___	___	___
Ferve o bico	___	___	___
Outra, explique:	_____		

(2) Após usar a mamadeira, como você geralmente limpa a mama-
deira (além do bico)?

	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>
Lava com água	___	___	___
Lava com sabão	___	___	___
Ferve a mamadeira	___	___	___
Outra, explique:	_____		

7. Eu vou nomear algumas bebidas. Diga-me, por favor, nos 7 dias an-
teriores ao início da doença, a criança ingeriu quais dos seguin-
tes alimentos líquidos:

<u>Bebida</u>	<u>Sim</u>	<u>Não</u>	<u>Desc</u>	<u>SE SIM, bebeu de uma mama-</u> <u>deira ou outra vasilha,</u> <u>ou ambos:</u>		
				<u>Mamadeira</u>	<u>Outra</u>	<u>Ambos</u>
<u>Leite de vaca</u>	___	___	___	___	___	___
<u>SE SIM, que tipo de</u> <u>Leite de vaca (A, B,</u> <u>C, outro, desc)</u>	_____					
<u>Leite em pó</u>	___	___	___	___	___	___
<u>Suco feito em casa</u>	___	___	___	___	___	___
<u>Água não fervida</u>	___	___	___	___	___	___
<u>Água fervida ou chá</u>	___	___	___	___	___	___

8. A criança usa chupeta?

___ Sim ___ Não ___ Desc

9. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia
ingerido, nos 7 dias anteriores ao início da doença? (como: novo
leite, fruta, carne, legumes, etc.)

___ Sim ___ Não ___ Desc

SE SIM, nome do(s) alimento(s): _____

10. Estas perguntas são sobre preparação da comida. Queremos saber como voce prepara os seguintes alimentos? (*nota código de onde guarda: 1=armário ou prateleira ou sobre o fogão, 2=fogão, 3=geladeira, 4=outra, 5=desc)

Alimento	A <u>criança</u> <u>consome</u> estes alimentos?			Prepara geralmente de <u>manhã</u> e <u>consome</u> no <u>jantar</u> ?				Prepara geralmente a <u>noite</u> e <u>consome</u> no <u>dia seguinte</u> ?			
	Sim	Não	Desc	Sim	Não	Desc	Se sim, onde guarda	Sim	Não	Desc	Se sim, onde guarda
Suco	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leite em pó	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chá	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arroz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Feijão	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sopa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

D. INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS - FAMÍLIA

Agora eu preciso fazer algumas perguntas sobre as outras pessoas da sua casa.

1. Quantas pessoas dormem na casa? _ _ _
 Em quantos cômodos elas dormem? _ _ _
Quantas outras pessoas dormem na mesma cama junto com esta criança? _ _ _

SE MAIS DE 10 PESSOAS DORMIREM NA CASA, VÁ PARA A QUESTÃO 3 (pági na 7)

2. Você precisa me dizer qual a idade de todas as pessoas da sua casa, exceto esta criança:

No.	Idade	Sexo		Alguma dessas pessoas teve <u>diarreia</u> nas duas semanas que precederam o início da doença nesta criança			Prepara ou <u>ajuda a preparar a comida</u>		
	(ano/mês)	M	F	Sim	Não	Desc	Sim	Não	Desc
(1)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(2)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(3)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(4)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(5)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(6)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(7)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(8)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—
(9)	— —	—	—	—	—	—	—	—	—

5. Estas perguntas são sobre o sanitário.

a. Onde é o sanitário da família?

- 1 ☐ dentro da casa
- 2 ☐ fora
- 3 ☐ ambos
- 4 ☐ não há sanitário
- 5 ☐ outro, descreva: _____
- 6 ☐ desconhecido

b. O sanitário é usado por outras famílias?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

c. Há água corrente dentro do sanitário?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

d. Você vê água servida saindo do seu sanitário, a céu aberto per-
to de sua casa?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

e. Que tipo de esgoto há na sua casa?

- 1 ☐ rede pública ou fossa
- 2 ☐ céu aberto
- 3 ☐ outros, descreva: _____
- 4 ☐ desconhecido

6. Há uma torneira para lavar as mãos dentro ou muito perto do sani-
tário?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

SE SIM, há sabonete para lavar as mãos, hoje?

☐ Sim ☐ Não ☐ Desc

7. Qual o tipo de papel disponível para higiene, no sanitário, hoje?

- 1 ☐ papel higienico comercializado
- 2 ☐ nenhum
- 3 ☐ outros, especificar: _____
- 4 ☐ desconhecido

(RESPONDER SOMENTE SE A PESSOA ENTREVISTADA FOR A MÃE OU QUEM CUIDA DA CRIANÇA).

8. Muitas pessoas não entendem como é difícil cuidar de uma criança pe-
quena, preparar a comida e cuidar da casa. Frequentemente não há
tempo para fazer tudo isto. Vou fazer algumas perguntas sobre al-
gumas coisas que a mãe muito ocupada, pode não ter tempo de fazer.
Você me dirá se faz algumas vezes estas coisas ou sempre, habitual-
mente, ou nunca:

a. Quando uma criança pe-
quena evacua e você a
limpa, você lava suas
maos apos?

b. Antes de preparar os
alimentos voce lava
as maos?

c. Após você usar o sa-
nitario voce lava as
suas maos?

d. Antes de você usar o
sanitario, voce lava
as suas maos?

9. Há na casa da criança um refrigerador funcionando hoje?

___ Sim ___ Não ___ Desc

10. Há na casa da criança algum animal?

___ Sim ___ Não ___ Desc

SE SIM:

Animal

Há na casa

Entra na casa

Sim Não Desc

Sim Não Desc

cachorro

gato

galinhas

outro

F. OUTROS DADOS

1. Até que ano da escola o chefe da família da criança cursou?

1 ___ Nenhum

2 ___ Primário Incompleto

3 ___ Primário Completo

4 ___ Ginásial Incompleto

5 ___ Ginásial Completo

6 ___ Colegial Incompleto

7 ___ Colegial Completo

8 ___ Post-colegial (universidade, ou profissional)

9 ___ Outro, explique: _____

10 ___ Desconhece

2. Qual é aproximadamente a renda total mensal na casa (em salários mínimos)? ___ ___ ___ salários (*nota 999=desc)

(Hoje, aproximadamente, um salário mínimo vale ___ ___ ___ dólares)