

## REINFECÇÕES POR ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DE BELÉM, PARÁ, BRASIL (\*)

Alexandre C. LINHARES (1), Ronaldo B. FREITAS (1), Yvone B. GABBAY (1) &  
Joana D'Arc M. PEREIRA (2)

### RESUMO

Reinfecções por rotavírus foram detectadas em 7 (9,2%) de 76 crianças habitantes da periferia de Belém, Pará, Brasil, no decurso de seus primeiros 20 meses de vida. A presença de rotavírus classificados no subgrupo II ("long pattern") foi assinalada, tanta na primeira como segunda infecções, em cinco desses indivíduos. Em duas situações, a primeira infecção foi causada por rotavírus subgrupo II e, a reinfecção, por rotavírus de subgrupo não claramente caracterizado. Seis diferentes padrões foram observados, não ocorrendo casos em que, numa única criança, se tenham assinalado perfis homólogos. O maior intervalo de tempo registrado entre duas infecções no mesmo indivíduo foi de 19 meses, enquanto que o menor, de 6. Formas sintomáticas em ambos os processos infecciosos se apresentaram em cinco crianças; em duas, os primeiros episódios revelaram-se assintomáticos, sucedendo-se quadros diarreicos. Em seis dos sete indivíduos, observaram-se soroconversões para rotavírus durante a segunda infecção; durante a primeira, entretanto, a elevação significativa nos níveis de anticorpos grupo-específicos se registrou em apenas um caso (Paciente F).

**UNITERMOS:** Rotavírus — Reinfecções por rotavírus em crianças  
Epidemiologia — Pará, Brasil

### INTRODUÇÃO

A importância dos rotavírus na etiologia das gastroenterites infantis agudas, tem sido assinalada através de múltiplas investigações, quer em países de clima temperado<sup>2,6,15,16</sup> quer em regiões tropicais<sup>10,23,24</sup>. Estima-se<sup>8</sup>, com efeito, que um milhão de óbitos por ano ocorreram entre crianças acometidas de quadro diarreico associado a esses agentes.

No Brasil, vários estudos<sup>4,5,28</sup> têm registrado a ocorrência de diarreias por rotavírus ressaltando-se invariavelmente a relevância que assumem esses patógenos. Na Amazônia, parti-

cularmente, LINHARES & col. têm relatado a expressiva frequência com que esses vírus incidem, tanto em comunidades urbanas<sup>20</sup> como em populações indígenas relativamente isoladas<sup>18</sup>.

Reconhecem-se atualmente<sup>32</sup>, cerca de quatro sorotipos e dois subgrupos de rotavírus capazes de infectar o homem, que podem ser detectados a partir de várias técnicas tais como: soroneutralização, fixação do complemento, imuno-microscopia eletrônica e ensaio imunoenzimático. A análise eletroforética do genoma viral, originalmente descrita como recurso diag-

(1) Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviços de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Caixa Postal 621, Belém, Pará, Brasil.

(2) Universidade Federal do Pará, Curso de Licenciatura em Biologia.

(\*) Trabalho desenvolvido no âmbito de convênio estabelecido entre a Organização Mundial de Saúde e a Fundação Serviços de Saúde Pública, do Ministério da Saúde.

nóstico por ESPEJO & col.<sup>11</sup>, tem sido utilizada por outros Autores com vistas à diferenciação dos rotavírus em dois subgrupos: I e II.

Investigações levadas a efeito por PEREIRA & col.<sup>26</sup> em três cidades do Brasil, assinalam a maior prevalência do subgrupo II entre crianças portadoras de quadro diarreico agudo. Infecções subsequentes em um mesmo indivíduo não se têm registrado até então em nosso país. Tais ocorrências repetidas, entretanto, foram observadas em um estudo prospectivo conduzido em uma creche na Bélgica<sup>13</sup>, onde cinco crianças exibiram quadros de gastroenterite aguda associados ao agente em questão, com aproximadamente um ano de diferença entre o primeiro e segundo episódios; não se determinaram, no entanto, os subgrupos ou sorotipos envolvidos.

RODRIGUES & col.<sup>27</sup> detectaram reinfecção por rotavírus em paciente de 12 meses de idade, acometido nas duas ocasiões (11 meses de diferença) de diarreia; nesse caso demonstrou-se a participação de dois sorotipos distintos.

Observações de BISHOP & col.<sup>3</sup> na Austrália também revelaram casos em que infecções neonatais foram sucedidas por outras, no curso dos três primeiros anos de vida. Dessas observações se concluiu que a infecção neonatal por rotavírus não confere imunidade contra uma subsequente, porém, protege contra o desenvolvimento, nessa última, de forma clinicamente severa.

Os presentes achados são relativos à ocorrência de reinfecções por rotavírus por primeiros 20 meses de vida, em 76 crianças habitantes da periferia da cidade de Belém, Pará, Brasil, observadas no âmbito de um estudo longitudinal em curso nessa comunidade. Aspectos etiológicos, clínicos e imunitários são discutidos em particular.

## MATERIAL E MÉTODOS

Crianças habitantes da periferia em Belém, Pará, em número de 76, foram acompanhadas ao longo de seus primeiros 26 meses de vida, face a um estudo prospectivo com duração prevista de três anos. Esses indivíduos pertencem a famílias que se caracterizam por baixas condições sócio-econômicas, tendo sido freqüente ob-

servar-se, no início da investigação (dezembro de 1982), muitas casas em que não era disponível a água potável; característico ainda é o elevado número de pessoas por residência (em geral de madeira com 1 a 2 cômodos), incluindo vários menores de 5 anos, vivendo sob precários padrões de higiene.

Ao nascimento colhiam-se: amostras de soro do cordão umbilical e da mãe, leite materno e mecônio do recém-nascido. Enquanto no hospital, as crianças eram visitadas diariamente, coletando-se fezes; por duas semanas após a alta hospitalar, ocorriam visitas domiciliares em dias alternados, quando se obtinham os mesmos espécimes; em casos de diarreia, além desse material, colhiam-se: soros agudo e convalescente, bem como a secreção láctea da mãe. Decorridas essas duas semanas, cada participante era visitado quinzenalmente, procedendo-se, sistematicamente, à coleta de fezes; em síndromes diarreicas, observava-se o anteriormente descrito.

Assinale-se que as mães foram orientadas quanto à caracterização dos episódios diarreicos: situações em que os espécimes exibem consistência anormal (pastosa ou aquosa), registrando-se várias (em geral mais de três) evacuações ao dia. Todos os pacientes portadores de quadro gastro-intestinal agudo eram atendidos à domicílio por um médico que, paralelamente à avaliação clínica, administrava, quando necessária, a terapêutica de reposição hídrica e eletrolítica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>31</sup>.

Todos os espécimes fecais foram testados quanto à presença de rotavírus pelo método imuno-enzimático estabelecido pela OMS, utilizando-se reagentes gentilmente cedidos pelo Dr. T. H. Flewett, "Regional Virus Laboratory, East Birmingham Hospital", Birmingham, Inglaterra. Em síntese, 100 µl de soro hiper-imune anti-rotavírus produzido em coelho, diluído 1:10.000 em solução-tampão de carbonato, pH 9,6, foi colocado em cada orifício de microplaca de poliestireno (NUNC 239454 ou Dynatech), incubando-se a 4°C "overnight". Procedeu-se então as seis lavagens sucessivas, imergindo-se completamente as placas em tampão de fosfato, pH 7,4, contendo Tween 20 (polisorbato), a uma concentração final de 0,1% v/v (PBS/T). A seguir adicionaram-se às placas pré-sensibilizadas,

75 µl por orifício, de PBS/T acrescido de EDTA (etileno-diamino-tetra-acetato), numa concentração final de 0,01 M (PBS/T/EDTA); 25 µl de suspensões de fezes clarificadas, a 10% em PBS, foram acrescidos em duplicata (2 orifícios por espécime). As microplacas foram incubadas a 4°C "overnight" e, após, lavadas como anteriormente descrito. Sucedeu-se a adição de 100 µl em cada orifício, de soro hiperimune anti-rotavírus obtido em cobaia, diluído a 1:10 000 em PBS/T com albumina bovina a 1% v/v (PBS/T/BSA); seguiu-se incubação a 37°C por 2 1/2 horas e imersão por 6 vezes consecutivas em PBS/T. Conjugado enzimático ("Kirkegaard and Perry") de imunoglobulina anti cobaia (proveniente de cabra) com a fosfatase alcalina 1:200 em PBS/T/BSA, foi então utilizado na quantidade de 100 µl por orifício. Nova incubação a 37°C, agora por 1 1/2 horas, foi observada, sucedendo-se lavagem. Substrato enzimático de fosfato de paranitrofenil (Sigma 104-105; 1 µg/ml) em dietanolamina a 10% v/v, pH 9,8, foi usado, sendo 100 µl por orifício. Depois de permanecer 20 min. a 37°C, a reação foi bloqueada através da adição de 50 µl de solução de hidróxido de sódio 3 M. A leitura das densidades ótica (D.O.) foi realizada em microespectrofotômetro (Flow ELISA — reader Multiskan), utilizando-se filtro de 405 Nm. Todos os espécimes que exibiram valores de D.O. superiores a 0,1 foram, preliminarmente, considerados como positivos; a seguir, submetidos a um "blocking test" utilizando soro hiperimune de cabra anti-rotavírus.

A classificação dos rotavírus em subgrupos foi estabelecida com base na eletroforese do genoma viral em substrato de gel de poliacrilamida. O método utilizado consistiu, basicamente, no descrito por LAEMMLI<sup>17</sup> contendo modificações propostas por PEREIRA & col.<sup>25</sup>. Na coloração utilizou-se o nitrato de prata.

A pesquisa de anticorpos grupo-específicos para rotavírus foi realizado consoante técnica previamente descrita<sup>19</sup>.

Tanto o isolamento como a identificação de enterovírus se processaram com base nos procedimentos descritos por MELNICK<sup>22</sup>.

Quanto às técnicas bacteriológicas, foram observadas aquelas recomendadas por EDWARDS & EWING<sup>9</sup> e, para o estudo das

toxinas lábil ("LT") e estável ("ST") de *Escherichia coli*, os métodos de EVANS & EVANS<sup>12</sup> e DEAN & col.<sup>7</sup>. Não se procedeu à tentativa de isolamento de *Campylobacter*.

O exame parasitológico foi essencialmente o direto em que os espécimes (o mais precocemente possível) foram misturados com solução salina fisiológica e examinados ao microscópio óptico comum.

## RESULTADOS

A distribuição temporal das sete reinfecções é representada na Fig. 1. Em apenas um caso (Paciente F) registrou-se primo-infecção no primeiro mês de vida, com desenvolvimento de quadro diarreico; as demais se observaram a partir dos três meses. O menor intervalo entre duas infecções na mesma criança foi de seis meses, em uma situação (Paciente C), enquanto que o mais prolongado, de 19, em outra (Paciente F). Todos os indivíduos foram infectados por rotavírus, pela primeira vez, no curso do primeiro ano de vida; as infecções subsequentes por outro lado, ocorreram de 12 a 20 meses de idade. Em cinco crianças, o subgrupo II foi assinalado em ambas as infecções; em outras duas não foi possível classificar-se as amostras associadas às reinfecções. Apenas duas situações revelaram-se assintomáticas.

A Fig. 2 oferece a representação esquemática dos resultados obtidos à análise eletroforética dos genomas dos rotavírus. O "long pattern" foi registrado em 12 das amostras. Observaram-se seis diferentes perfis, todos compatíveis com o subgrupo II, porém, não se registraram homologies ao comparar-se os padrões da primeira e segunda infecções, em quaisquer dos casos em questão.

Dados relativos ao quadro clínico e à etiologia dos processos diarreicos são exibidos na Tabela I. Em dois pacientes, o segundo episódio revelou-se clinicamente mais severo que o primeiro; em duas outras situações ocorreu o inverso. Registre-se ainda um caso (Paciente B) em que as síndromes diarreicas foram de severidades comparáveis e, outros dois, em que a primo-infecção se caracterizou como assintomática. Concomitância de rotavírus e outros enteropatógenos observou-se em 5 episódios diarreicos: *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* ente-

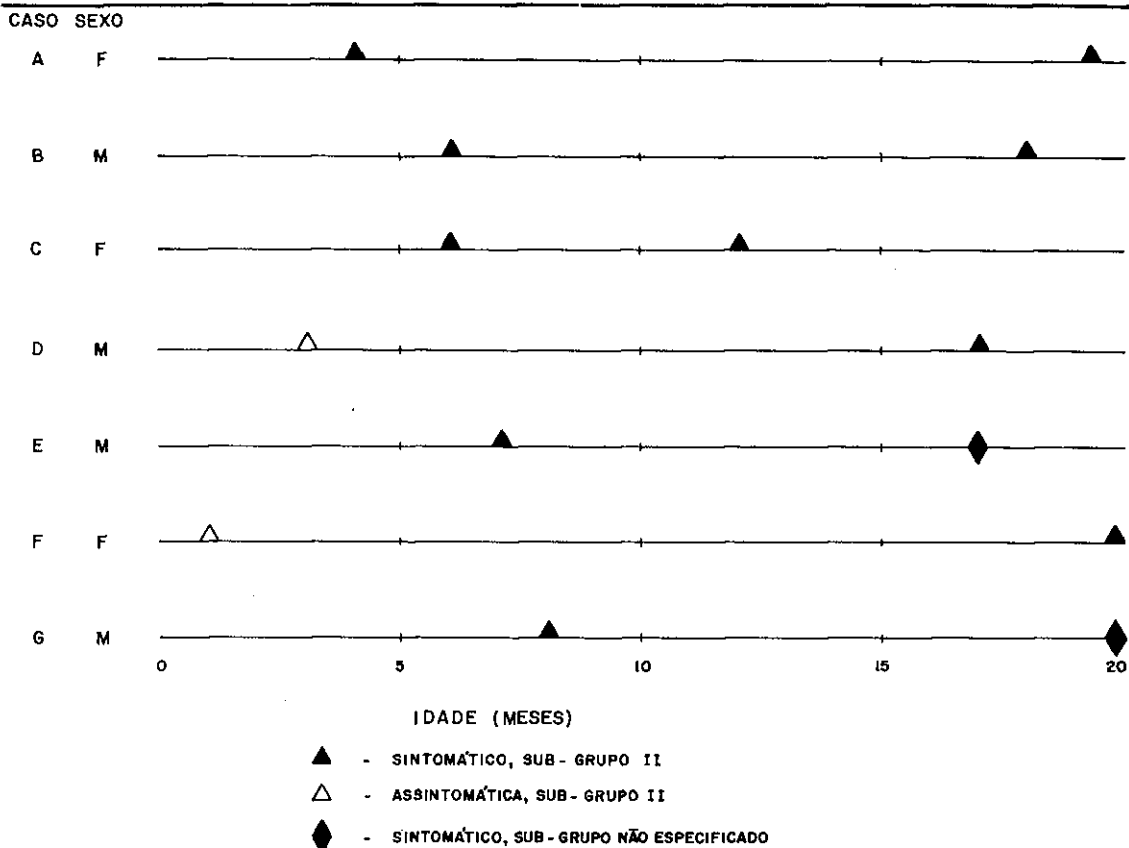


Fig. 1 — Distribuição temporal das infecções por rotavírus em sete crianças habitantes de Belém, Pará.

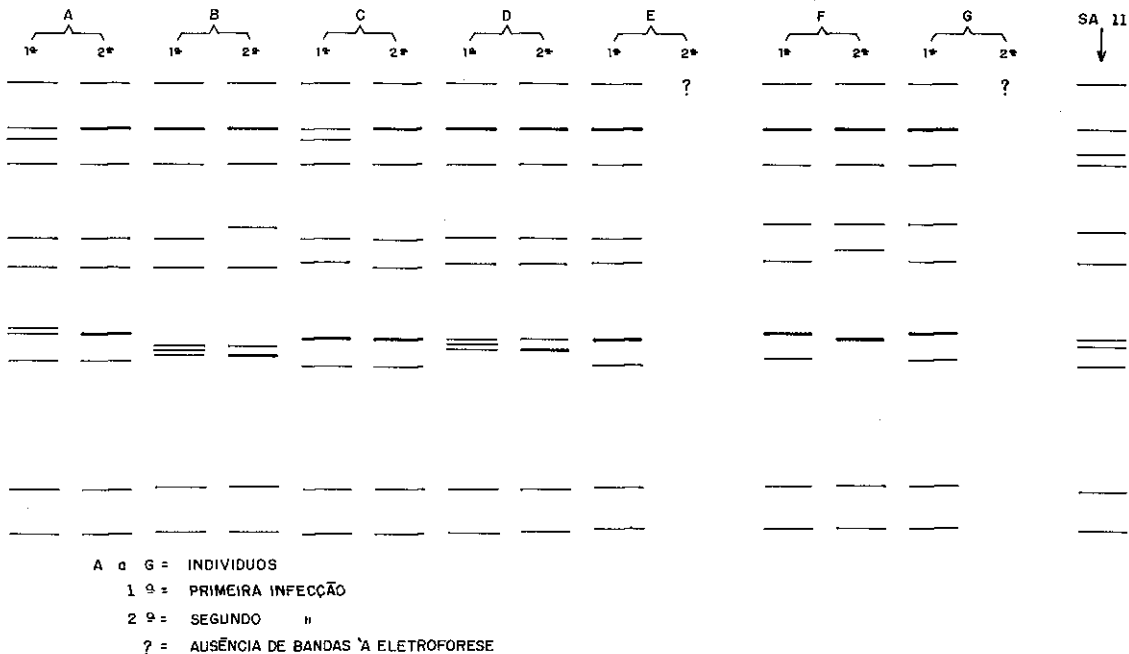


Fig. 2 — Representação esquemática dos perfis eletroforéticos obtidos nos sete casos de reinfecção em crianças de Belém, Brasil.

rotoxigênicas (positiva para "LT") foram detectados em um espécime (Paciente A) obtido à primeira infecção: em outro caso (Paciente C) assinalaram-se, na primeira e segunda ocorrências, respectivamente, esporos de cogumelos em brotamento e *E. coli* enteropatogênica. Fungos também ocorreram em um material (Paciente E) e, *E. histolytica*, em outro (Paciente F). Esses dois últimos em segundas infecções associadas a rotavírus.

A Tabela II reúne os resultados relativos à pesquisa de imunidade para rotavírus. Em apenas uma das primo-infecções (Paciente F) se detectou viragem sorológica (soro agudo negativo e, convalescente, positivo); em outro (Paciente E) se denotou nítido declínio no nível de anticorpos (provavelmente de origem materna) comparando-se a primeira e segunda amostras. Em contrapartida, nas reinfecções, denotaram-se invariavelmente soroconversões.

## DISCUSSÃO

Sete casos de reinfecção por rotavírus foram detectados no curso de um estudo longitudinal na área de Belém, Pará, Brasil. Investigações anteriores<sup>2,13,27</sup>, também assinalaram a ocorrência de infecções repetidas por esse agente em um mesmo indivíduo. FONTEYNE & col.<sup>13</sup> relataram o acometimento de uma criança aos três meses, por subgrupo I, sucedendo-se, um ano após, gastroenterite mais severa pelo II. Note-se que em nosso estudo não se observou infecção pelo subgrupo I.

RODRIGUEZ & col.<sup>27</sup> no México, descreveram caso de uma criança que desenvolveu dois episódios de diarreia, com 11 meses de diferença um do outro, em que foram envolvidos dois sorotipos. É possível que tal condição se tenha observado em Belém, uma vez que nossos dados se restringem à classificação em subgrupos.

Em uma (Paciente F) das sete crianças analisadas, ocorreu primo-infecção por subgrupo II nos primeiros 30 dias de vida. Dezenove meses depois notou-se gastroenterite por rotavírus com manifestações clínicas leves (sem sinais de desidratação), envolvendo também perfil eletroforético longo. Tal condição foi assinalada por BISHOP & col.<sup>3</sup>, ao evidenciarem que os sintomas associados à infecção por esse vírus,

são significativamente menos freqüentes e severos, em crianças antes infectadas na fase neonatal.

Os intervalos de tempo observados entre duas infecções consecutivas em nosso estudo, variaram de 6 a 19 meses. As iniciais situaram-se, invariavelmente, no primeiro ano de vida, enquanto as reinfecções, no segundo. A ocorrência desses episódios subsequentes suscita a hipótese de associação a sorotipos heterólogos. Com efeito, alguns Autores<sup>1</sup> referem existir até quatro variedades antigênicas capazes de infectar o homem, diferenciáveis por técnicas de neutralização.

Não obstante em cinco casos de reinfecção, se tenham registrado subgrupos homólogos, admite-se o envolvimento de sorotipos diversos. Testes complementares, com vistas a elucidar esse aspecto, serão processados no "WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rotavirus", Birmingham Inglaterra. Acresça-se que a ocorrência do subgrupo II, corrobora achados anteriormente obtidos por PEREIRA & col.<sup>26</sup>, em três cidades do Brasil. Os dois casos em que não se estabeleceu claramente o perfil eletroforético, talvez tenham decorrido da baixa concentração de ácido nucléico obtida a partir das amostras examinadas.

A análise genômica em questão, no presente estudo, revelou seis diferentes padrões.

Esses achados configuram o amplo espectro já antes relatado por LOURENÇO & col.<sup>21</sup>, que detectaram 29 perfis desiguais em amostra bastante superior à nossa.

Em quatro episódios diarreicos denotou-se a presença de outros enteropatógenos associados a rotavírus, destacando-se: *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e clássica, esporos de cogumelos em brotamento e *E. histolytica*. Note-se que tais associações foram previamente assinaladas<sup>20</sup> em investigações envolvendo crianças atendidas em hospitais de Belém, Brasil.

Em apenas dois casos a segunda infecção, do ponto de vista clínico, revestiu-se claramente de maior severidade de que a primeira; em duas outras situações observou-se o inverso. Um fator que poderia determinar tais condições seria a natureza antigênica dos rotavírus relacio-

T A B E L A I  
Quadros clínicos observados em sete indivíduos com reinfecção por rotavírus e concomitância de outros enteropatógenos

Paciente	Infecções/Idade (meses)	Subgrupo de rotavírus	Leite materno	Manifestações clínicas (duração em dias)					Febre	Grau de desidratação	Outro patógeno detectado ***
				Diarréia aquosa	Náuseas	Vômitos	Cólicas abdominais				
A	1. <sup>a</sup> / 4	II	Não	3	3	3	—	3	I	Shigella sonnei e E. coli enterotoxigênica (LT)	
	2. <sup>a</sup> / 20	II	Não	5	4	4	4	—	II		
B	1. <sup>a</sup> / 6	II	Não	2	2	2	2	2	—	—	
	2. <sup>a</sup> / 18	II	Não	4	—	—	4	3	—		
C	1. <sup>a</sup> / 6	II	Sim	2	2	2	—	—	—	Esporos de cogumelos em brotamentos E. coli enteropatógena	
	2. <sup>a</sup> / 12	II	Sim	3	3	3	3	3	II		
D	1. <sup>a*</sup> / 3	II	Não							—	
	2. <sup>a**</sup> / 17	II	Não								
E	1. <sup>a</sup> / 7	II	Sim	5	—	—	5	5	I	—	
	2. <sup>a</sup> / 17	?	Não	1	—	—	—	1	—		
F	1. <sup>a*</sup> / 1	II	Sim							Esporos de cogumelos em brotamento E. histolytica	
	2. <sup>a</sup> / 20	II	Não	2	1	1	—	—	—		
G	1. <sup>a</sup> / 8	II	Sim	7	6	6	—	6	I	—	
	2. <sup>a</sup> / 20	?	Sim	2	—	—	2	2	—		

\* = assintomático \*\* = caso clínico não acompanhado \*\*\* = exames bacteriológicos e parasitológicos só foram processados em casos de diarreia. "LT" = positiva para toxina lábil ? = subgrupo não claramente definido

T A B E L A II  
Anticorpos (\*) para rotavírus nas sete crianças que sofreram reinfecção

Paciente	1.ª infecção		2.ª infecção	
	S(1)	S(2)	S(1)	S(2)
A	31,35	29,59	0,0	100
B	1,76	0,0	0,0	100
C	13,24	12,03	12,43	100
D	8,78	0,0	0,0	45,13
E	25,85	2,57	6,08	100
F	0,0	100	NC	100
G	16,62	16,76	0,0	100

(\*) = Expressos em percentagens de bloqueio; resultados superiores a 25 indicativos de positividade

S(1) = Soro colhido durante a fase aguda da doença ou

poucos dias antes de detectar-se rotavírus

S(2) = Amostra obtida na convalescença, ou cerca de 20 dias após a colheita do espécime fecal positivo

NC = Não colhido

nados aos quadros diarreicos em questão; nesse particular ressaltam-se os achados de YOLKEN & col.<sup>33</sup>, caracterizando a maior expressão patogênica do subgrupo II, sorotipo I. Em nosso estudo, note-se que a concomitância de outros patógenos, não parece ter interferido no estabelecimento de condições clínicas mais ou menos expressivas.

Outro provável condicionante do quadro clínico foi o tipo de aleitamento administrado à criança durante o processo infeccioso. Não obstante alguns Autores<sup>30</sup> destaquem o possível papel protetor do leite materno contra infecções por rotavírus, isso não se observou no presente estudo. Com efeito, um dos indivíduos, cujo primeiro episódio revelou-se clinicamente mais severo que o segundo, recebia aleitamento natural quando houve primo-infecção; paradoxalmente, durante a reinfecção, menos severa, a alimentação era artificial.

Na Tabela II avaliou-se o estado imunitário no curso das infecções estudadas. BISHOP & col.<sup>3</sup> assinalam que a ocorrência de rotavírus durante a fase neonatal não confere, em geral, imunidade para rotavírus. Em nosso estudo, a única viragem sorológica detectada em primo-infecção, envolveu criança infectada em seu primeiro mês de vida (Paciente F).

Por outro lado, às reinfecções, o fenômeno da soroconversão foi registrado em seis indivíduos. Tais resultados, aparentemente contraditórios, merecem avaliação mais precisa, a par-

tir de observações que abranjam uma amostra de maiores proporções.

## SUMMARY

### Reinfections by rotavirus in children living in Belém-Pará — Brazil

Reinfections caused by rotavirus were detected in 7 (9.2%) out of 76 children from Belém, Pará, Brazil, followed up since birth to twenty months of age. Rotavirus subgrupo II ("long pattern") in both infections was noted in five children. In two, the first infection was associated with subgroup II and the second ones with a strain whose electropherotype was not determined. Six different electropherotypes were observed in these cases and no homologous profiles were associated with reinfections in the same child. The length of time between the two infections ranged from six to 19 months. Diarrhoea in both infections was observed in five children; in two of them, however, first episodes were asymptomatic. Seroconversions to rotavirus were noted in six of the seven children, during reinfection. In the first infections, however, seroconversion was observed in only one case (Paciente F).

## AGRADECIMENTOS

Formulamos nosso agradecimentos ao apoio técnico proporcionado pelos Srs. Antônio Francisco Pires Martins e Antônio de Moura, bem como pelo trabalho datilográfico das Srtas. Simone Rosa de Oliveira e Maria da Conceição Mendes Chagas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BEARDS, G. M.; PILFOLD, J. M.; THOULESS, M. S. & FLEWETT, T. H. — Rotavirus serotypes by serum neutralization. *J. med. Virol.*, 5: 231-237, 1980.
2. BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H. & HUCK, B. J. — Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute, non bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2: 1281-1283, 1973.
3. BISHOP, R. F.; BARNES, G. L.; CIPRIAN, E. & LUND, J. S. — Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective longitudinal study in young children. *New Engl. J. Med.*, 309: 72-76, 1983
4. CANDEIAS, J. A. N.; ROSEMBURG, C. P. & RACZ, M. L. — Identificação por contra-imuno-eleto-osmofo-

- rese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde Públ. São Paulo*, 12: 99-103, 1978.
5. COIRO, J. R. R.; BENDATI, M. de A.; ALMEIDA NETO, A. J. de; HEUSER, M. C. F. & VASCONCELOS, V. L. — Rotavírus infection in Brazilian children with acute enteritis: A seasonal variation study. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 32: 1186-1188, 1983.
  6. DAVIDSON, G. P.; TOWNLEY, R. R. W.; BISHOP, R. F. & HOLMES, I. H. — Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, 1: 242-251, 1975.
  7. DEAN, A. C.; CHINC, J.; WILLIAMS, R. G. & HARDEN, L. B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant in ice: application in study diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125: 407-411, 1972.
  8. DUPONT, H. L. — Rotavírus gastroenteritis — some recent developments. *J. Infect. Dis.*, 149: 663-666, 1984.
  9. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing Company, 1972.
  10. ESPARZA, J.; VIERA DE TORRES, B.; PINERO, A.; CARMONA, F. O. & MAZZALI DE ILJA, R. — Rotaviruses in Venezuelan children with gastroenteritis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 26: 148-151, 1977.
  11. ESPEJO, R. T.; CALDERON, E. & GONZALEZ, N. — Distinct reovirus-like agents associated with infantile gastroenteritis. *J. clin. Microbiol.*, 6: 502-506, 1977.
  12. EVANS, D. J. & EVANS, D. C. — Direct serological assay for the heatlabile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16: 604-609, 1977.
  13. FONTEYNE, J.; ZISSIS, G. & LAMBERT, J. P. — Recurrent rotavírus gastroenteritis. *Lancet*, 1: 983, 1978.
  14. KALICA, A. R.; GREENBERG, H. B.; ESPEJO, R. T.; FLORES, J.; WYATT, R. G.; KAPIKIAN, A. Z. & CHANOCK, R. M. — Distinctive ribonucleic acid patterns in human rotavírus subgroups 1 and 2. *Infect. Immun.*, 33: 958-961, 1981.
  15. KAPIKIAN, A. Z.; KIM, H. W.; WYATT, R. G.; RODRIGUEZ, W. J.; ROSS, S.; CLINC, W. L.; PARROT, R. H. & CHANOCK, R. M. — Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhoea and development of serologic test. *Science*, 185: 1049-1053, 1974.
  16. KONNO, T.; SUZUKI, H. IMAI, A. & ISHIDA, H. — Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: faecal shedding and serological response. *J. infect. Dis.*, 135: 259-266, 1977.
  17. LAEMMLI, U. K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
  18. LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A. & BEARDS, G. M. — An outbreak of rotavírus diarrhoea among a nonimmune isolated South American Indian Community. *Amer. J. Epidem.*, 113: 703-710, 1981.
  19. LINHARES, A. C.; FERREIRA, F. S.; MAUÉS, B. C.; BENCHIMOL, J. A. & GABBAY, Y. B. — Prevalência de anticorpos para rotavírus em crianças diarréicas de Belém, Brasil. *Rev. Fund. SESP*, 28: 95-105, 1983.
  20. LINHARES, A. C.; MONÇÃO, H. C.; GABBAY, Y. B.; ARAUJO, V. L. C. de; SERRUYA, A. C. & LOUREIRO, E. C. B. — Acute diarrhoea associated with rotavírus among children living in Belém, Brazil. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 77: 384-390, 1983.
  21. LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, J. C.; COHEN, J.; SCHERRER, R. & BRICOUT, F. — Study of human rotavírus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol. (Paris)*, 132: 161-173, 1981.
  22. MELNICK, J. L. & WENNER, H. A. — Enteroviruses. In: LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J. — Diagnostic procedures for viral and Rickettsial infections. 4th ed. New York, American Public Health Association, 1969. Chapter 17, p. 529-602.
  23. PANIKER, C. K. J.; MATHEW, S. & MATHAN, M. — Rotavírus and acute diarrhoeal disease in children in a Southern Indian Coastal Town. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 60: 123-127, 1982.
  24. PAUL, M. O. & ERINLE, E. A. — Rotavírus infection in Nigerian infants and young children with gastroenteritis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 31: 374-375, 1982.
  25. PEREIRA, H. G.; LEITE, J. P. G.; AZEREDO, R. S.; FARIAS, V. de & SUTMOLLER, F. — An atypical rotavírus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 78: 245-250, 1983.
  26. PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N. RACZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. & TRABULSI, L. R. — Electrophoretic study of the genome of human rotavírus from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg. (Lond.)*, 90: 117-125, 1983.
  27. RODRIGUEZ, W. J.; KIM, H. W.; BRANDT, C. D.; YOLKEN, R. H.; ARROBIO, J. O.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. & PARROT, H. H. — Sequential enteric illness associated with different rotavírus serotypes. *Lancet*, 2: 37, 1978.
  28. SUTMOLLER, G.; AZEREDO, R. S.; LACERDA, M. D.; BARTH, O. M.; PEREIRA, H. G.; HOFFER, E. & SCHATZMAYR, H. G. — An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavírus and *Shigella sonnei* in a private school in Rio de Janeiro. *J. Hyg. (Lond.)*, 88: 285-293, 1982.
  29. THOULESS, M. E.; BEARDS, G. M. & FLEWETT, T. H. — Serotyping and subgrouping of rotavírus strains. *Arch. Virol.*, 73: 219-230, 1982.
  30. TOTTERDELL, B. M.; CHRYSTIE, I. L. & BANATVALA, J. E. — Cord blood and breastmilk antibodies



- in neonatal rotavirus infection. *Brit. med. J.*, 1: 828-830, 1980.
31. WHO/UNICEF — The management of diarrhoea and use of oral rehydration therapy. A joint WHO/UNICEF Statement, Geneva, 1983.
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Nomenclature of human rotaviruses: designation of subgroups and serotypes. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 62: 501-503, 1984.
33. YOLKEN, R. H.; WYATT, R. G.; ZISSIS, G.; BRANDT, C. D.; RODRIGUEZ, J. W.; KIM, W. H.; PARROT, R. H.; URRUTIA, J. J.; MATA, L.; GREENBERG, H. B.; KAPIKIAN, A. Z. & CHANOCK, R. M. — Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *New Engl. J. Med.*, 299: 1156-1161, 1978.

Recebido para publicação em 4/6/1985.