

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELENICE STROPARO

ANÁLISE ANTIGÊNICA E GENÔMICA DOS ADENOVÍRUS ISOLADOS EM  
PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURITIBA

2012

ELENICE STROPARO

ANÁLISE ANTIGÊNICA E GENÔMICA DOS ADENOVÍRUS ISOLADOS EM  
PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Infectologia Pediátrica

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina de Oliveira Rodrigues

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELA AUTORA

S924 Stroparo, Elenice

Caracterização dos subgêneros dos adenovírus associados à  
infecção respiratória em pacientes pediátricos atendidos no Hospital de  
Clínicas da UFPR / Elenice Stroparo. – Curitiba, 2012.

127 f. : il.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina de Oliveira Rodrigues

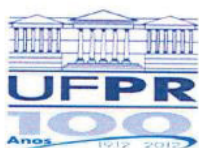
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sonia Mara Raboni

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da  
Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

1. Infecções por adenovírus humanos. 2. Filogenia.
  3. Sinais e sintomas. 4. Evolução fatal. 5. Análise de sequência.
- I. Rodrigues, Cristina de Oliveira. II. Raboni, Sonia Mara.  
III. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do  
Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do  
Paraná. IV. Título.

NLMC: WC 505



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado  
em Saúde da Criança e do Adolescente



## *Parecer*

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente**, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a Doutoranda *Elenice Stroparo*, em relação ao seu trabalho de Tese intitulado: **“ANÁLISE ANTIGÊNICA E GENÔMICA DOS ADENOVÍRUS ISOLADOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ”**

é de parecer favorável à *Aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de *Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente*, área de concentração em *Infectologia Pediátrica*

A obtenção do título de Doutor está condicionada as correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste Curso de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de maio de 2012.

  
*Professora Cristina de Oliveira Rodrigues*  
UFPR, Orientadora e Presidente da Banca Examinadora.

  
*Professora Sonia Mara Raboni*  
UFPR, Co-Orientadora do Trabalho.

  
*Professora Lúcia de Naronha*  
PUC-PR, Primeira Examinadora.

  
*Professora Ana Luiza Pamplona Mosimann*  
FIOCRUZ, Segunda Examinadora.

  
*Professora Luine Raefle Renaud Vidal*  
UFPR, Terceira Examinadora.

  
*Professor Carlos Antonio Riedi*  
UFPR, Quarto Examinador.

  
*Professora Rosana Marques Pereira*  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar e me guiar. Solicito sempre os dons do Vosso Espírito para ser vencedor nas provações, forte na dor, perseverante na caridade e sensível às pessoas que sofrem.

Aos meus pais, Luis e Terezinha, que não me deram somente a vida, mas as sábias lições de esperança e de humildade e por todos os sacrifícios que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Lisete e Elcio, por sempre torcerem por mim.

À Professora orientadora Dr.<sup>a</sup> Cristina de Oliveira Rodrigues agradeço por ter assumido a orientação desta tese, tendo-me brindado com importante colaboração na discussão do trabalho, dosando as críticas com comentários de incentivo.

À Professora co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Sônia Mara Raboni, pela sugestão do tema, por me estimular a dedicação a este estudo e por sua permanente solicitude em todas as fases do projeto, tanto no estudo laboratorial como clínico.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Mônica Nunes Lima, que muito me ajudou a superar as dificuldades, estimulando-me a seguir em frente e pela contribuição estatística indispensável na concretização deste trabalho.

Ao Setor de Virologia do qual fazem parte Dr.<sup>a</sup> Luine Rosele Vidal, Dr.<sup>a</sup> Meri Bordignon Nogueira, Dr. Sérgio Monteiro de Almeida, Gislene Reche de Almeida Takahashi, Clyete Silveira, Luciane Aparecida Pereira, Indianara Rotta, Marcirene Andriow, Bárbara, Luis Felipe Pessa e Adelina Moraes pelo apoio.

À Maria do Carmo Debur, pela indescritível solidariedade e valiosa parceria no aprender-fazer do cotidiano das análises laboratoriais.

Aos colegas de trabalho da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) pelo apoio e palavras de incentivo.

Ao Ricardo, pelo companheirismo e realização das análises de bioinformática.

À Norma Mello, agradeço pela amizade, apoio e boa disposição que sempre manifestou.

À secretária da Pós-graduação, Clara Lara Freitas, pela colaboração com documentações e apoio durante todo esse período.

À Universidade Federal do Paraná, especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, pela acolhida e pelo interesse revelado na execução e conclusão do mesmo.

Ao Programa CAPES, pelo auxílio financeiro ao longo de dois anos.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus colegas de curso e a todos os professores que comigo compartilharam do seu saber.

A todos,

O meu Eterno Obrigada.

Elenice Stroparo

“Deus me dê **Serenidade** para aceitar as coisas que não posso mudar, **Coragem** para mudar aquilo de que sou capaz e **Sabedoria** para ver a diferença.”

(Autor desconhecido)

## RESUMO

O Adenovírus humano foi descrito em 1953 e apresenta considerável relevância nas infecções respiratórias, devido à elevada frequência e gravidade das manifestações clínicas. Nas infecções respiratórias agudas vem sendo um dos principais motivos de mortalidade mundial em crianças menores de cinco anos. Os objetivos do presente estudo foram padronizar a técnica de detecção genética do adenovírus humano para introdução na rotina do laboratório de virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; comparar as características operacionais do método de biologia molecular padronizado com as técnicas de pesquisa de antígeno viral e isolamento celular para o adenovírus humano; estudar a caracterização genômica viral e sua associação com a evolução clínica de adenovírus humano isolados em amostras de aspirado de nasofaringe desde o ano de 1996 até o ano de 2008; relatar aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes pediátricos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná infectados por adenovírus humano. O estudo foi realizado retrospectivamente em 22 amostras armazenadas de aspirado de nasofaringe e prospectivamente em 11 amostras. O DNA foi extraído utilizando o método do tiocianato de guanidina e a *nested* PCR foi realizada para amplificar um fragmento de 168 pb do gene hexon do adenovírus. A subtipagem dos vírus detectados foi realizada por enzima de restrição e por sequenciamento genético. Os dados clínicos dos pacientes infectados foram obtidos dos prontuários médicos. A *nested* PCR foi padronizada, para o gene hexon, no setor de biologia molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os subgêneros encontrados por enzima de restrição e sequenciamento foram B:1, B:2, C e D. Foram obtidas 31 sequências para o gene VA-RNA, das quais, 19 representam sequências de consenso entre ambas as fitas do DNA, enquanto em outras 12 apenas uma das fitas apresentava condições para análise. A análise da árvore filogenética foi organizada com as sequências nucleotídicas obtidas para o gene VA-RNA. Os valores de divergência genética entre as amostras obtidas por este estudo identificadas como de um mesmo grupo apresentaram uma grande variação, com os altos valores de divergência sendo encontrados nos subgêneros B:1 tipo 3 e B:1 sorotipo 7 e baixos valores de divergência entre as demais linhagens. Os resultados de cultura de células demonstraram uma maior sensibilidade do que a Imunofluorescência e menor sensibilidade do que os resultados da PCR. A incidência do HAdV foi maior em crianças com idade inferior a dois anos. Os sintomas mais observados foram taquipneia, esforço respiratório, febre, taquicardia e tosse. Houve coinfeções virais em seis casos (18,2%). Doze pacientes hospitalizados (36%) evoluíram para o óbito. Os subgêneros que mais levaram à internação em Unidade de Tratamento Intensivo e a óbito foram B:1 e C.

**Palavras-chave:** Adenovírus humanos; Análise de sequência de DNA; Filogenia; Infecção respiratória; Sintomas; Evolução fatal.

## ABSTRACT

The adenovirus was described in 1953 and has considerable significance in respiratory infections due to high frequency and severity of clinical manifestations. Acute respiratory infections have been a major source of global mortality in children under five years. The objectives of this study were to standardize the molecular detection of adenovirus for introduction into the routine at the virology laboratory of the Hospital de Clinicas, Federal University of Paraná (HC-UFPR), to compare the operational characteristics of the molecular biology method with standard techniques of viral antigen research and isolation in cell culture to study viral genomic characterization study and its association with clinical isolates of adenovirus in nasopharyngeal aspirate samples from the year 1996 until the year 2008, reporting epidemiological and clinical aspects of pediatric patients infected with adenovirus at HC-UFPR. The study was conducted retrospectively on 22 nasopharyngeal aspirate stored samples and prospectively in 11. DNA was extracted using the guanidine thiocyanate method and nested PCR was performed to amplify a 168 bp fragment of the adenovirus hexon gene. The subtyping of the virus was performed by restriction enzyme and genetic sequencing. The clinical data of infected patients were obtained from medical records. The nested PCR was standardized in the laboratory of molecular biology of the HC-UFPR. The subgenus found by restriction enzyme and sequencing were B:1, B:2, C and D. It was obtained 31 sequences for the VA-RNA gene, of which 19 represent consensus sequences of both strands of DNA, while in the remaining only is could be analysed. The incidence of adenovirus was higher in children younger than two years. The symptoms observed were tachypnea, respiratory distress, fever, tachycardia, and coughing. There was viral co-infections in six cases (18.2%). Twelve hospitalized patients (36%) died. The analysis of phylogenetic tree was organized with the nucleotide sequences obtained for the VA-RNA gene. The values of genetic divergence among the samples obtained by this study identified as a group varied widely, with high values of divergence being found in subgenus B:1 serotype 3 and serotype 7 and low levels of divergence between the other strains. The subgenus that led to more admissions in the Intensive Care Unit and death were B:1 and C. The results of cell culture showed a higher sensitivity than the immunofluorescence and lower sensitivity than the PCR.

**Key words:** Adenoviruses human, Sequence analysis DNA, Phylogeny, Respiratory infection, Symptoms, Fatal outcome.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTÂNCIA FILOGENÉTICA DOS GENES HEXON DA FAMÍLIA <i>ADENOVIRIDAE</i> .....	6
FIGURA 2	ESTRUTURA DE UM ADENOVÍRUS.....	10
FIGURA 3	RECEPTORES CELULARES UTILIZADOS PELOS HADV PARA ADSORÇÃO COM AS CÉLULAS-ALVO.....	12
FIGURA 4	A ENTRADA DO HADV NA CÉLULA.....	13
FIGURA 5	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO ADENOVÍRUS, SUAS REGIÕES DE TRANSCRIÇÃO E GENES.....	15
FIGURA 6	FLUXOGRAMA: MODO DE OBTENÇÃO DAS 33 AMOSTRAS DE HADV ANALISADAS NESTE ESTUDO.....	33
FIGURA 7	LÂMINAS ANALISADAS EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	37
FIGURA 8	EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO PELO ADENOVÍRUS EM CÉLULAS HEp-2.....	38
FIGURA 9	DETERMINAÇÃO DOS SUBGÊNEROS DE HADV UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	43
FIGURA 10	DIAGRAMA REPRESENTANDO TODOS OS PRODUTOS DO GENE VA-RNA DIGERIDOS COM A <i>Taq</i> I.....	44
FIGURA 11	PRODUTOS DA DIGESTÃO DO GENE VA-RNA DO HADV INDICANDO OS SUBGÊNEROS A, B:2 e F.....	44
FIGURA 12	PRODUTOS DA DIGESTÃO DO GENE VA-RNA DO HADV INDICANDO OS SUBGÊNEROS B:1, C, D e E.....	45
FIGURA 13	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA <i>NESTED</i> PCR PARA DETECÇÃO DO GENE HEXON (168 pb) DO HADV.....	49
FIGURA 14	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DOS AMPLIFICADOS PELA PCR SUBGÊNEROS PARA DETECÇÃO DO GENE VA-RNA DO HADV.....	51
FIGURA 15	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DO SEGMENTO DO GENE VA-RNA AMPLIFICADO POR PCR DIGERIDO OU NÃO PARA DETERMINAÇÃO DOS SUBGÊNEROS.....	52
FIGURA 16	PORCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS (DE 1996 A 2008) PARA HADV DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, POR IFI, CONGELADAS NO	

	LABORATÓRIO DE VIROLOGIA.....	54
FIGURA 17	SUBGÊNEROS DE HADV ENCONTRADOS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO EM AMOSTRAS DE ANF DE 33 CRIANÇAS HOSPITALIZADAS ENTRE 1996 A 2008 .....	54
FIGURA 18	ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA NO PROGRAMA <i>GARLI</i> UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DO <i>GENE VA-RNA</i> PARA DIFERENTES GRUPOS E TIPOS DE HADV.....	61
FIGURA 19	ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR INFERÊNCIA BAYESIANA NO PROGRAMA <i>BEAST</i> UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DO <i>GENE VA-RNA</i> PARA DIFERENTES GRUPOS E TIPOS DE HADV.....	62
FIGURA 20	FREQUÊNCIA MENSAL DO HADV DETECTADO POR PCR EM CURITIBA, PARANÁ, NO ANO DE 2008, DO ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO E MÉDIA TEMPERATURA MENSAL .....	68
FIGURA 21	MODELO DE COLETA/OBTENÇÃO DE ASPIRADO DE NASOFARINGE (ANF).....	124

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	SUBGÊNEROS E TIPOS DE ADENOVÍRUS HUMANO.....	7
QUADRO 2	PROTEÍNAS DO ADENOVÍRUS, LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO....	10
QUADRO 3	DOENÇAS CAUSADAS POR ADENOVÍRUS HUMANO .....	16
QUADRO 4	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA <i>NESTED</i> PCR.....	40
QUADRO 5	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E SÍTIOS DE CORTE.....	43
QUADRO 6	SEQUÊNCIAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO <i>GENBANK</i> .....	46
QUADRO 7	AMOSTRAS SEQUENCIADAS NESTE ESTUDO E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO <i>GENBANK</i> .....	63
QUADRO 8	COMPONENTES DO SORO BOVINO FETAL E SUAS PROVÁVEIS FUNÇÕES.....	113

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA PCR E IFI	50
TABELA 2	RESUMO DOS RESULTADOS DE DETERMINAÇÃO DE SUBGÊNEROS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO E SEQUENCIAMENTO .....	55
TABELA 3	VALORES DE SIMILARIDADE GENÉTICA DENTRO DE CADA GRUPO DE HADV AMOSTRADO.....	56
TABELA 4	SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:1, SOROTIPO 3 PARA O GENE VA-RNA .....	57
TABELA 5	SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:1, SOROTIPO 7 PARA O GENE VA-RNA .....	57
TABELA 6	SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:2, PARA PARA O GENE VA-RNA .....	57
TABELA 7	SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO C, PARA PARA O GENE VA-RNA .....	58
TABELA 8	SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO D PARA PARA O GENE VA-RNA .....	59
TABELA 9	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS 33 PACIENTES COM HADV POSITIVO.....	64
TABELA 10	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS 33 PACIENTES COM HADV POSITIVO.....	65
TABELA 11	SUBGÊNEROS DE HADV IDENTIFICADOS E EVOLUÇÃO PARA INTERNAÇÃO EM UTI E ÓBITOS.....	67
TABELA 12	ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE VA-RNA DE DIFERENTES GRUPOS DE HADV (APÊNDICE VII).....	120

## LISTA DE SIGLAS

ANF	- Aspirado de nasofaringe
ECP	- Efeito citopático
FLUA	- Vírus influenza A
FLUB	- Vírus influenza B
GUSCN	- Tiocianato de Guanidina
HAdV	- Adenovírus humano
HC - UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HEp-2	- Células de carcinoma de laringe
HRV	- Rinovírus humano
IFI	- Imunofluorescência indireta
IRA	- Infecção respiratória aguda
pb	- Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PIV1	- Vírus parainfluenza humano tipo 1
PIV3	- Vírus parainfluenza humano tipo 3
RSV	- Vírus sincicial respiratório
VA-RNA	- Gene presente no genoma viral; RNA associado ao vírus (VA-RNA I e VA-RNA II)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	2
1.2	OBJETIVOS.....	3
1.2.1	Objetivo Geral.....	3
1.2.2	Objetivos Específicos.....	3
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1	HISTÓRICO .....	4
2.1.1	Taxonomia e Filogenia.....	5
2.2	DESCRIÇÃO DO ADENOVÍRUS.....	9
2.2.1	Estrutura do Adenovírus.....	9
2.2.2	Receptores Celulares Utilizados pelos HAdV e Penetração Viral.	11
2.2.3	Composição do Genoma e Replicação Viral.....	14
2.2.4	Tipos e HADV e Patogenia.....	16
2.3	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O HADV.....	18
2.3.1	Isolamento em Cultura Celular.....	19
2.3.2	Microscopia Eletrônica.....	20
2.3.3	Imunofluorescência.....	21
2.3.4	Ensaio Imunoenzimático.....	22
2.3.5	Reação em Cadeia da Polimerase.....	23
2.3.5.1	<i>Nested</i> PCR e RFLP .....	24
2.3.5.2	<i>Multiplex</i> PCR .....	24
2.3.5.3	PCR em Tempo Real.....	24
2.3.6	Sequenciamento e Análise Filogenética .....	25
2.4	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	26
2.4.1	Fatores de Risco .....	30
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	32
3.2	CASUÍSTICA.....	32
3.2.1	Critérios de Inclusão.....	34
3.2.2	Critérios de Exclusão.....	34
3.2.3	Amostras dos Anos de 1996 a 2007.....	34
3.2.4	Amostras do ano de 2008.....	34

3.3	MÉTODO .....	35
3.3.1	Imunofluorescência Indireta (IFI).....	36
3.3.1.1	IFI realizada diretamente da amostra de ANF.....	36
3.3.1.2	IFI realizada da amostra inoculada em células de cultura (HEp-2).....	36
3.3.2	Isolamento em Cultivo Celular .....	37
3.3.3	<i>Nested</i> PCR Para a Detecção do Gene Hexon.....	39
3.3.3.1	Extração do DNA viral.....	39
3.3.3.2	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Nested</i> PCR).....	39
3.3.3.3	Detecção do produto amplificado .....	41
3.3.3.4	Controles positivo e negativo para a realização do método da PCR .....	41
3.3.4	Identificação de Subgêneros dos HAdV por PCR.....	41
3.3.4.1	Detecção do produto amplificado.....	42
3.3.4.2	Determinação dos subgêneros por restrição enzimática .....	42
3.3.4.3	Determinação dos subgêneros por sequenciamento genético.....	45
3.3.4.4	Obtenção das sequências e análises filogenéticas .....	45
3.3.4.5	Alinhamento e escolha de modelo de evolução de DNA .....	46
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
3.5	ÉTICA EM PESQUISA .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
4.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>NESTED</i> PCR PARA DETECÇÃO DO HADV.....	49
4.2	COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DAS TÉCNICAS DE PESQUISA DE ANTÍGENO VIRAL E ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR PARA O HADV .....	49
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA VIRAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS HADV ISOLADOS .....	51
4.3.1	Determinação dos Subgêneros dos HAdV .....	51
4.3.1.1	Subtipagem por enzima de restrição .....	52
4.3.1.2	Subtipagem por sequenciamento genético .....	53
4.3.1.3	Análise filogenética .....	56

4.4	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS DO HC-UFPR INFECTADOS POR HADV.....	64
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82
7	<b>APÊNDICES</b> .....	108
	Formulário de Coleta de Dados Epidemiológicos pediatria .....	108
	Formulário de Coleta de Dados Laboratoriais .....	110
	Preparo do Tampão de Tiocianato de Guanidina .....	111
	Protocolo HAdV – <i>Nested</i> -PCR .....	112
	Materiais utilizados para Cultura Celular .....	113
	Protocolo HAdV Subgêneros .....	119
	Alinhamento das Sequências do gene VA-RNA .....	120
	Artigo .....	123
8	<b>ANEXOS</b> .....	124
	Procedimento de Coleta do ANF .....	124
	Protocolo de Purificação do produto da PCR para sequenciamento .....	126
	Autorização do Comitê de Ética .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

O adenovírus humano (HAdV) pertence a um importante grupo de agentes causadores de doenças, que podem provocar em adultos e em crianças infecções respiratórias, urinárias, oculares e gastroentéricas. O vírus é encontrado no mundo todo e pode circular de forma esporádica, endêmica ou epidêmica no inverno, primavera ou começo do verão (SPENCER, CHERRY, 1987). Infecções generalizadas podem ser encontradas em indivíduos transplantados ou portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

As infecções respiratórias agudas (IRA) apresentam um período de evolução menor de 15 dias e são a causa mais frequente de morbidade e mortalidade mundial (VALERO *et al.*, 2009). Nas IRA, os vírus são os principais agentes etiológicos, sendo responsáveis por 45 a 60% de todas as doenças respiratórias em crianças. O vírus sincicial respiratório (RSV), o rinovírus humano (HRV) e os HAdV são os mais frequentes (CANDUCCI *et al.*, 2008). Crianças com doença respiratória causada por HAdV exibem uma ampla diversidade de sintomas envolvendo febre, faringites, inflamações tonsilares, faringo-conjuntivais, bronquiolites e pneumonias (VIEIRA *et al.*, 2001). No Brasil, os principais tipos de HAdV relacionados a casos de IRA são os do subgênero C (tipos 1, 2, 5 e, menos frequentemente, 6) e B (tipos 3 e 7) (MOURA *et al.*, 2007). No Paraná, caracteristicamente, ocorre uma menor taxa de infecções por HAdV que em outros estados (TSUCHIYA *et al.*, 2005; CHONG *et al.*, 2009). O HAdV tem um aspecto clínico muito importante, faz doença pulmonar obstrutiva grave em crianças com persistência dos sintomas.

O primeiro estudo referindo as relações filogenéticas entre os tipos de HAdV foi realizado por Bailey e Mautner, no ano de 1994. Em 1995, utilizando a análise das sequências do gene VA-RNA, Kidd *et al.* estabeleceram relações filogenéticas entre os tipos de HAdV causadores de doenças em humanos e em alguns macacos.

Indivíduos infectados por HAdV podem apresentar quadros brandos, sem importância clínica, ou exibir quadros graves com desfecho fatal. A biologia molecular tem contribuído para o diagnóstico das viroses respiratórias e, por esse motivo, a caracterização genômica do HAdV e sua associação com a evolução clínica é de importância, assim como o conhecimento do impacto desse patógeno para a saúde e a possibilidade de fomentar estudos sobre a patogenia, investigação da variabilidade genética e distribuição do HAdV.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O laboratório de virologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) mantém armazenadas amostras clínicas de pacientes com pesquisa de HAdV positiva há mais de 14 anos, material que permite análise retrospectiva destes agentes, responsáveis por infecções de significativa gravidade na população pediátrica atendida neste hospital. Trata-se, assim, de um estudo inédito nesta região, que objetiva contribuir para o melhor conhecimento da caracterização genética deste vírus em um meio hospitalar.

A implantação de métodos de caracterização genética dos HAdV neste laboratório de virologia auxilia a embasar a orientação de controle da disseminação de sorotipos altamente virulentos em setores de atendimento críticos como berçários, emergência e unidades de terapia intensiva.

Este projeto vem complementar uma lacuna de relevância técnica e científica no estudo de vírus responsáveis por infecções respiratórias, em especial o HAdV.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Identificar os subgêneros e tipos dos HAdV isolados a partir de amostras clínicas de pacientes pediátricos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Padronizar a técnica de detecção genética de HAdV para introdução na rotina do laboratório de virologia do HC-UFPR;
- 2) Comparar as características operacionais das técnicas de pesquisa de antígeno viral e detecção molecular para o HAdV;
- 3) Descrever a caracterização genômica dos HAdV isolados, em amostras de aspirado de nasofaringe (ANF), desde o ano de 1996 até o ano de 2008, associando-os à evolução clínica dos pacientes;
- 4) Relatar aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes pediátricos do HC-UFPR infectados por HAdV.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

Dois grupos de pesquisadores que estudaram a etiologia das infecções respiratórias agudas isolaram o adenovírus. Em 1953, Rowe *et al.* observaram a replicação de um vírus desconhecido presente em culturas de células primárias de adenoides humanas. Em 1954, Hilleman e Werner, isolaram de secreções respiratórias de recrutas americanos um agente que induzia alterações citopáticas em culturas de células humanas (HORWITZ, 2001). O nome adenovírus, nomenclatura atual, foi criado por Enders *et al.* (1956).

Em 1962, Trentin *et al.* descreveram pela primeira vez que um vírus humano poderia induzir o desenvolvimento de tumores malignos em animais. Os autores observaram que um tipo de HAdV (tipo 12) era capaz de desenvolver tumores em roedores e que as células transformadas seriam capazes de produzir novos tumores, quando inoculadas em animais imunologicamente compatíveis. Porém, poucos tipos servem como modelos para a indução de câncer em animais (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009).

Infecção respiratória aguda por HAdV causou significativa morbidade em populações de treinamento militar. A história da prevenção de HAdV entre estagiários militares dos EUA, por meio de vacinação, era rotina no início na década de 1970, com taxas de eficácia de 82% a 95% (GAYDOS, GAYDOS, 1995). Desde 1971 a doença respiratória aguda foi controlada com o uso de vacinas para os HAdV sorotipos 4 e 7. Este programa de imunização superou problemas significativos em relação a altas taxas de morbidade e as epidemias foram quase esquecidas (GRAY *et al.*, 2006). Devido a um atraso de produção, foi cessada a administração da vacina nos postos de treinamento militar na primavera de 1994 (GAYDOS, GAYDOS, 1995) com inevitável aumento da morbidade (GRAY *et al.*, 2006).

O alto índice de doenças respiratórias implica elevada alocação de recursos médicos e encargos econômicos decorrentes desta infecção. No entanto, existe pouca informação sobre os reais custos de tratamento das infecções respiratórias (BIRNBAUM *et al.*, 2002).

### 2.1.1 Taxonomia e Filogenia

O adenovírus pertence à família *Adenoviridae*, a qual pode ser filogeneticamente dividida em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, constituído por vírus que infectam mamíferos; *Aviadenovirus*, que infectam aves; *Siadenovirus*, que infectam aves, anfíbios e peixes; *Atadenovirus*, que infectam ruminantes, aves e marsupiais (DAVISON, BENKO, HARRACH, 2003) (Figura 1).

Os pesquisadores discutem sobre a criação de um novo gênero, *Fishadenovirus*, devido à identificação de um adenovírus isolado de esturção, cujas características não se enquadram em nenhum dos gêneros existentes (DAVISON, BENKO, HARRACH, 2003).

A classificação dos HAdV em subgêneros ocorreu pelo fato de apresentarem grande variabilidade genética e, por consequência, diferentes proteínas virais (WIGAND *et al.*, 1986). Essa classificação se baseia nas propriedades de hemaglutinação e neutralização que são relevantes na taxonomia dos HAdV (MADISCH *et al.*, 2005). Porém, outras particularidades, como capacidade de induzir tumores, proporção de guanina e citosina no DNA, dimensão do genoma, organização genômica e homologia do DNA, comprimento da fibra, tecido-alvo e epidemiologia, definem os subgêneros a que pertencem os HAdV. Os dados citados são os critérios utilizados distinguir o subgênero do HAdV e sua preferência por determinado órgão (HIERHOLZER *et al.*, 1988; TIEMESSEN e KIDD, 1995; JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009; MAHY e VAN REGENMORTEL, 2010).

Os taxonomistas acordam que a distância genética, realizada por novas técnicas como a análise filogenética, são mais fidedignas em comparação com os testes de neutralização viral, pois, com esta, a única informação adquirida sugere o parentesco de alguns antígenos importantes (o hexon e fibras relacionados com epítomos de adenovírus) alocando-os em subgêneros, enquanto as técnicas moleculares confrontam os genes completos a fim de determinar diferenças ou semelhanças entre os HAdV (BENKÖ *et al.*, 2005).

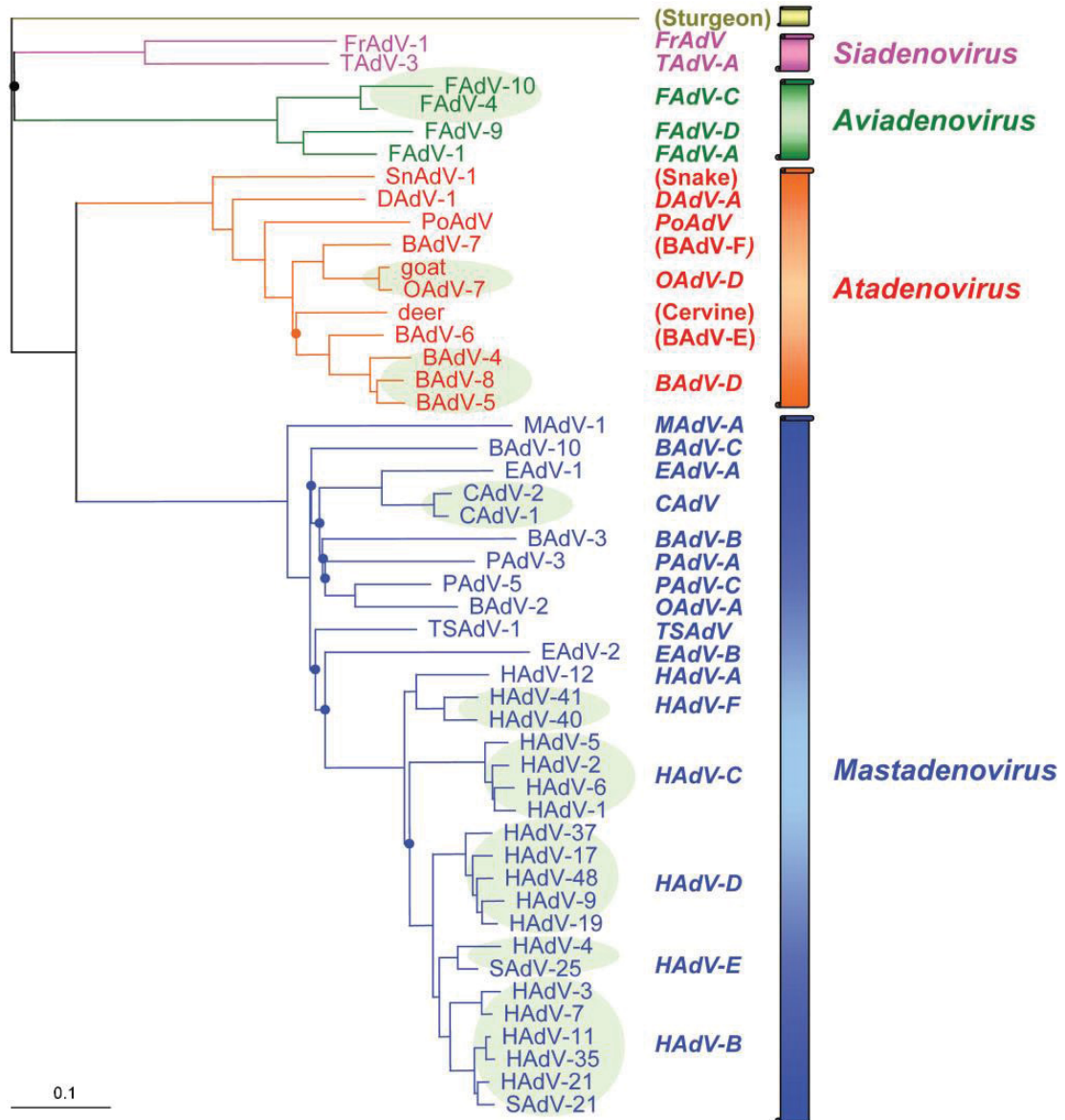


FIGURA 1- DISTÂNCIA FILOGENÉTICA DOS GENES HEXON DA FAMÍLIA ADENOVIRIDAE

NOTA : Os membros de cada gênero são indicados em cores diferentes, e os vírus que pertencem ao mesmo subgênero são agrupados por círculos ovais. As abreviações dos nomes dos vírus são indicadas nas extremidades dos ramos. Os subgêneros listados são: B (bovino), C (canino), D (pato), E (equino), F (aves), Fr (sapo), H (humano), M (murino), O (ovino), P (suíno), Po (gambá), Sn (cobra), T (peru) e TS (primata primitivo). A distância filogenética foi calculada com base na sequência nucleotídica do gene hexon, disponível no *Genbank*. HAdV (adenovírus humano), SAdV (*simian adenovirus* – infectante para o macaco)

FONTE : DAVISON, BENKO e HARRACH (2003)

O HAdV pertence ao gênero *Mastadenovirus* e neste encontram-se bem definidos, até o momento, 56 tipos distribuídos em sete subgêneros (A – G), de acordo com as características antigênicas, morfológicas e moleculares (Quadro 1), (De JONG *et al.*, 1999; SHENK, 2001; MADISCH *et al.*, 2005; MAJHEN e AMBRIOVIÉ-RISTOV, 2006; SANTOS, ROMANOS, WIGG; 2008; COLLIER, KELLAM, OXFORD, 2011).

Pesquisas recentes trazem propostas de novos tipos de HAdV; Jones *et al.* (2007) apresentaram em seu trabalho a caracterização de um novo HAdV, o tipo 52, que muito provavelmente pertence a uma nova espécie humana, para a qual foi proposta a denominação HAdV G. Este novo HAdV foi confirmado por sequenciamento genômico e análise filogenética, detectado em um paciente durante um surto de gastroenterite. Esse estudo sugere que o HAdV-52 pode ser um dos muitos agentes que causam gastroenterite de etiologia desconhecida. Em 2009, na Nona Conferência Internacional de Virologia (Hungria), foram discutidos os dados caracterizados por genômica e bioinformática que definiram dois outros HAdV patogênicos e recombinantes: tipos D53 e D54 (WALSH *et al.*, 2010). Foi identificado também um patógeno respiratório re-emergente, o HAdV-B55, que contém uma recombinação parcial do hexon (ZHU *et al.*, 2009). Na França, Robinson, *et al.* (2011) relatam o isolamento do HAdV D56 que causou fatalidade em um recém-nato, e ceratoconjuntivite em três trabalhadores de saúde que cuidaram desta criança. Possivelmente o vírus encontrado apresenta tropismo ocular. Com base nesses dados, esse vírus parece ser um novo tipo do subgênero D (HAdV-D56), ressaltando a importância de eventos de recombinação na evolução dos HAdV e o aparecimento de novos adenovírus patogênicos.

QUADRO 1 – SUBGÊNEROS E TIPOS DE ADENOVÍRUS HUMANO

SUBGÊNEROS	TIPOS
A	12,18, 31
B:1	3, 7, 16, 21, 50 } 55
B:2	11, 14, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56
E	4
F	40, 41
G	52

FONTE: MAJHEN, AMBRIOVIÉ-RISTOV, (2006); ROBINSON, *et al.* (2011), BUCKWALTER, *et al.* (2012) – Modificado pelo autor

Até o momento, 56 diferentes tipos foram identificados e agrupados em sete diferentes subgêneros humanos, estabelecendo um novo subgênero, o qual denominaram subgênero G, segundo Walsh *et al.* (2010) e Mandelboim *et al.* (2011). Porém, os cientistas têm relatado que os tipos 52 a 56, recém-descobertos, podem ter origem em recombinações genéticas (rearranjos) entre os tipos já existentes (MANDELBOIM *et al.*, 2011).

O novo subgênero G se faz presente na página de classificação dos HAdV no “*International Committee on the Taxonomy of Viruses*” (ICTV). O sequenciamento completo dos novos isolados evidenciados (tipos 52 a 56) encontram-se na página “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI).

Observa-se no Quadro 1 que o subgênero B, ao contrário dos demais, é dividido em subgênero B:1 e B:2. Esta subdivisão foi baseada em análise de enzima de restrição. Os tipos pertencentes à B:1, exceto HAdV-50, são comumente associados com doenças respiratórias, enquanto os membros do B:2 raramente estão relacionados a esta patologia, exceto os HAdV-14 e HAdV-11 (SETO *et al.*, 2009).

A Filogenia é um ramo da ciência que procura estabelecer as relações evolutivas ou de parentesco presente em um grupo de táxons ou as unidades taxonômicas operacionais (OTU – *Operational Taxonomic Unit*). As árvores são representações gráficas das relações entre as OTU. A classificação taxonômica atual utiliza dados moleculares para realização das análises filogenéticas (GEVERS *et al.*, 2006). O alinhamento das sequências é um passo fundamental para o estudo filogenético, porque ele nos permite definir as posições idênticas (VINUESA *et al.*, 2005).

Para classificar o HAdV em subgêneros e tipos, a análise filogenética de fragmentos selecionados do genoma viral tem sido cada vez mais utilizada (EBNER, PINSKER, LION, 2005). Suas aplicações vão desde a detecção de casos de coinfeção com múltiplas espécies de HAdV até a identificação de novas linhagens recombinantes (MADISCH *et al.*, 2005). Finalmente, a análise filogenética tem se tornado uma ferramenta importante na investigação epidemiológica de surtos de doença causados pelo HAdV (YEUNG *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento de ensaios clínicos para detectar HAdV, o número de sequências conhecidas de hexon tem aumentado rapidamente. Esses ensaios envolvem hibridização do DNA e técnicas de PCR utilizando oligonucleotídeos

iniciadores específicos para o gene hexon tornando possível sua análise filogenética (RUX, KUSER, BURNETT, 2003).

Dentre os 56 tipos de HAdV, apenas alguns estão associados com risco de vida e doenças disseminadas em pacientes imunodeficientes; a detecção de um desses tipos pode ter valor prognóstico e levar a uma intervenção terapêutica imediata. A tipagem molecular também é útil para investigações epidemiológicas (MADISCH *et al.*, 2005).

O HAdV tem sido estudado intensamente por mais de 50 anos como modelo de interação vírus-célula e ultimamente como vetor gênico (RUSSELL, 2009). Ao longo da última década, avanços tecnológicos na biologia estrutural têm ajudado a esclarecer as primeiras fases de replicação do HAdV, bem como as interações do vírus com o sistema imune do hospedeiro (NEMEROW *et al.*, 2009).

## 2.2 DESCRIÇÃO DO ADENOVÍRUS

### 2.2.1 Estrutura do Adenovírus

A partícula viral do adenovírus não possui envelope e o genoma é constituído de DNA linear de fita dupla. Todos os adenovírus apresentam a mesma estrutura geral: partículas virais de simetria icosaédrica, sem invólucro e com um diâmetro médio de 80nm. A molécula de DNA apresenta aproximadamente 36 kb contendo cerca de 40 genes (DAVISON, BENKÖ, HARRACH, 2003).

A Figura 2 mostra a estrutura do adenovírus, na qual pode-se observar as proteínas que fazem parte de sua organização.

Os adenovírus apresentam capsídeo constituído por 252 capsômeros: 240 hexons, que formam as 20 faces triangulares, e 12 pentons, que formam os vértices do icosaedro. Com o advento de técnicas de análise estrutural, estão descritas 13 proteínas estruturais e todas elas desempenham papel diante de uma infecção na célula hospedeira (DAVISON, BENKÖ, HARRACH, 2003).

Os principais antígenos adenovirais são a fibra (proteína IV), hexon (proteína II) e penton (proteína III), sendo importantes na classificação do vírus e diagnóstico da doença (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009). Esses antígenos são produzidos em grande quantidade, podendo ser detectados no sobrenadante das células infectadas e, por isso, denominados antígenos solúveis. Hexon e penton são

os principais componentes da superfície da partícula viral, sendo que o hexon atua como antígeno, sendo a partícula mais imunogênica (SABAN *et al.*, 2006).

Os pentons ocorrem nos 12 vértices do capsídeo e as fibras se projetam a partir de cada penton. A base penton apresenta atividade parecida à de uma toxina, levando ao rápido aparecimento de efeitos citopáticos e descolamento das células na superfície na qual estão crescendo (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009). No Quadro 2 estão apresentadas as diversas proteínas do vírus, sua localização e função conhecida.

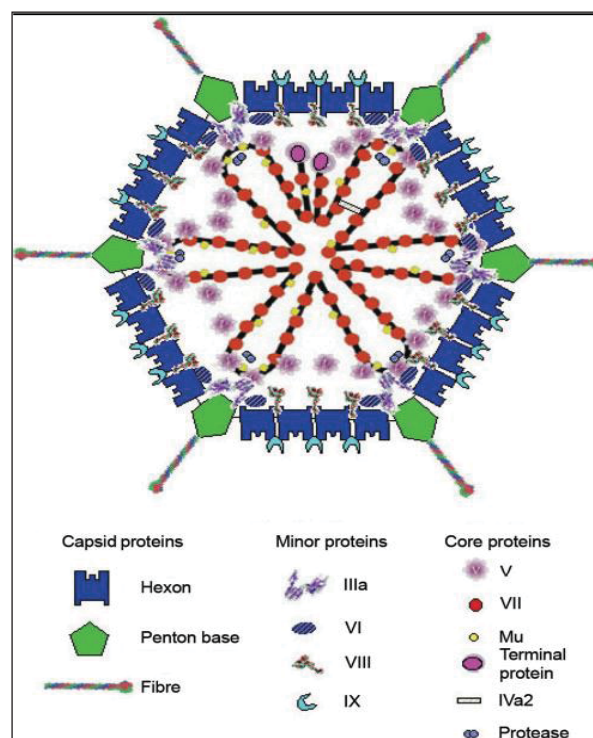


FIGURA 2 - ESTRUTURA DE UM ADENOVÍRUS

NOTA: As principais proteínas do capsídeo são: hexon, penton e fibra. O capsídeo é estabilizado externamente pela proteína pIX. As demais proteínas do capsídeo (pIIIa, pVI e pVIII), foram localizadas por meio da microscopia crioeletrônica. Apenas um subconjunto de hexons está associado com pVI. No interior são encontradas as proteínas: terminais, Mu, V e VII, que estão associadas com o genoma viral.

FONTE: SABAN *et al.* (2006); RUSSELL (2009)

QUADRO 2 – PROTEÍNAS DO ADENOVÍRUS, LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO

PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO CONHECIDA
II (hexon)	Capsídeo viral	Estrutural
III (penton)	Capsídeo viral	Penetração
IIIa	Proteína do capsídeo ligada ao penton	Penetração
IV (fibra)	Capsídeo viral	Receptor ligante; hemaglutinação
V	Proteína interna ligada ao DNA	Histonas e Enovelamento do DNA
VI	Proteína do capsídeo ligada ao hexon	Estabilização da partícula viral
VII	Proteína interna ligada ao DNA	Histonas e Enovelamento do DNA
VIII	Proteína do capsídeo ligada ao hexon	Estabilização da partícula viral (?)
IX	Proteína do capsídeo ligada ao hexon	Estabilização da partícula viral (?)
TP (proteína terminal)	Core	Facilita a replicação do DNA
Mu	Core	Propriedades semelhantes às Protaminas. Enovelamento do DNA
IVa2	Core	Processo de montagem específica do vírus e regulação da transcrição
Protease	Core	Facilita a lise celular na fase inicial da infecção

FONTE: SANTOS, ROMANOS, WIGG (2008) - Adaptado pela autora

NOTA: As interrogações representam que as funções de determinadas proteínas, presentes nos adenovírus, ainda não estão bem esclarecidas

Os HAdV são relativamente resistentes aos solventes orgânicos e aos ácidos, porém, são inativados pelo calor (56°C / 10 min), desinfetantes e detergentes. São relativamente estáveis dentro e fora das células do hospedeiro e podem se manter infectantes à temperatura ambiente por duas semanas (LEITE, 1994; De CARVALHO, JOHNSTON, FONSECA, 2007).

### 2.2.2 Receptores Celulares Utilizados pelos HAdV e Penetração Viral

A interação inicial com células hospedeiras é mediada por uma elevada afinidade de interação da fibra com um receptor celular. Para quase todos os tipos de HAdV, os receptores são o Coxsackie-Adenovírus (CAR) ou a molécula denominada CD46 (BERGELSON *et al.*, 1997; GAGGAR, SHAYAKHMETOV, LIEBER, 2003; NEMEROW *et al.*, 2009).

Os HAdV tipos 5 e 2 ligam-se ao receptor denominado CAR (imunoglobulina) (BERGELSON *et al.*, 1997). Em 2002, Cohen *et al.* detectaram esta imunoglobulina nas junções dos epitélios e indicaram que ela teria a função de manter a integridade juncional dessas células (PATZKE *et al.*, 2010). A molécula de adesão CAR apresenta dois domínios extracelulares (ZHANG, BERGELSON, 2005) e é expressa em muitos tipos celulares, incluindo hepatócitos, superfície basolateral

das células epiteliais, células endoteliais, mioblastos, cérebro, pâncreas, intestino, pulmões, fígado, rins e células de músculo cardíaco. Células linfoides não expressam CAR, mas são um reservatório para infecções persistentes pelo HAdV que utilizam tal receptor (COHEN *et al.*, 2002; ZHANG, BERGELSON, 2005). Os diferentes sorotipos de HAdV que se ligam à molécula CAR o fazem com diferentes graus de afinidade. Ao contrário dos sorotipos dos subgêneros A, C, D, E e F, a maioria dos sorotipos do subgênero B liga-se a uma proteína de membrana denominada CD46 (ROELVINK *et al.*, 1998, SIRENA *et al.*, 2004).

O subgênero B é dividido em subgênero B:1 cujos sorotipos causam infecção do trato respiratório superior, e o subgênero B:2, cujos tipos causam infecção do rim e do trato urinário, porém há indícios de que alguns de seus tipos também infectam o trato respiratório (SIRENA *et al.*, 2004; MARTTILA *et al.*, 2005; FLEISCHLI *et al.*, 2007). A maioria dos tipos dos subgêneros B utiliza a molécula CD46 como principal receptor celular; entretanto, o subgênero B:2, na recente investigação de Pache *et al.* (2008), revela uma baixa afinidade de ligação com a molécula CD46, ou seja, a ligação do vírus ocorre com menor eficiência, porém acontece (CUPELLI *et al.*, 2010). Em humanos, CD46 é expressa na maioria das células nucleadas sendo uma proteína reguladora do sistema complemento, inativando-o e preservando as células da lise (CATTANEO, 2004). A Figura 3 ilustra os receptores celulares utilizados para ligação pelos HAdV às células-alvo. Para o subgênero G ainda não há estudos quanto aos receptores celulares utilizados.

Além da molécula CD46, os HAdV do subgênero B, tipos 3, 7 e 11 também se ligam a CD80 e CD86, que são moléculas presentes em linfócitos B e células dendríticas, afirma-se que estas podem ser utilizadas por todos os HAdV do subgênero B (SHORT *et al.*, 2006).

Na superfície das células, o ácido siálico (SA) é uma molécula comumente utilizada como receptor para vários patógenos (ARNBERG, 2009), como é o caso de alguns tipos do subgênero D que se ligam ao ácido siálico causando ceratoconjuntivite, como uma alternativa de ligação à molécula de adesão conhecida como CAR (ARNBERG *et al.*, 2002).

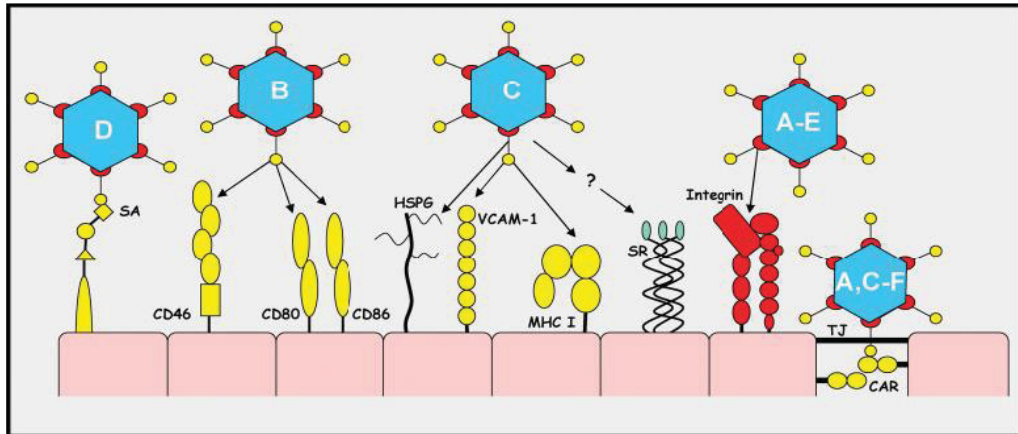


FIGURA 3 - RECEPTORES CELULARES UTILIZADOS PELOS HAdV PARA ADSORÇÃO COM AS CÉLULAS-ALVO

NOTA: Da esquerda para a direita: O HAdV D liga-se ao ácido siálico (SA) por meio da esférula da fibra (representada em amarelo) causando ceratoconjuntivite; o HAdV B liga-se às moléculas CD46, CD80 ou CD86 por meio da esférula da fibra. O HAdV C utiliza o eixo da fibra (linha preta) para se ligar ao heparan sulfato (HSPG), e também, através da esférula da fibra pode se ligar à molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) ou com a classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC-I); os tipos dos HAdV A-E apresentam o RGD (Arginina, Glicina, Aspartato) no penton base (em vermelho) o qual interage com as integrinas. HAdV A e C-F utilizam a esférula da fibra e ligam-se à molécula de adesão célula-a-célula (presente nas junções intercelulares) conhecida como CAR, a qual é expressa basolateralmente e lateralmente, no ápice das células epiteliais não polarizadas logo abaixo da zona de oclusão (*Tight junction* - TJ)

FONTE: ARNBERG (2009)

A molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) pertence à classe das imunoglobulinas e intercede na adesão dos leucócitos às células endoteliais mediando sua migração para os sítios inflamatórios. Aparentemente VCAM-1 facilita a adsorção do vírus à célula (CHU *et al.*, 2001).

Outros receptores utilizados pelos HAdV podem ser o heparan sulfato (HSPG), o complexo maior de histocompatibilidade I (MHC I) e integrinas.

Dada a complexa estrutura do capsídeo do HAdV, não é surpreendente que a interação do vírus com as células hospedeiras também seja complicada. O vírus se fixa às células por meio das fibras; a interação do penton com integrinas celulares, após a fixação, promove a etapa de internalização em endossomas, porém, cerca de 90% das partículas virais saem dos endossomas para o citoplasma (WICKHAM *et al.*, 1993), como observado na Figura 4.

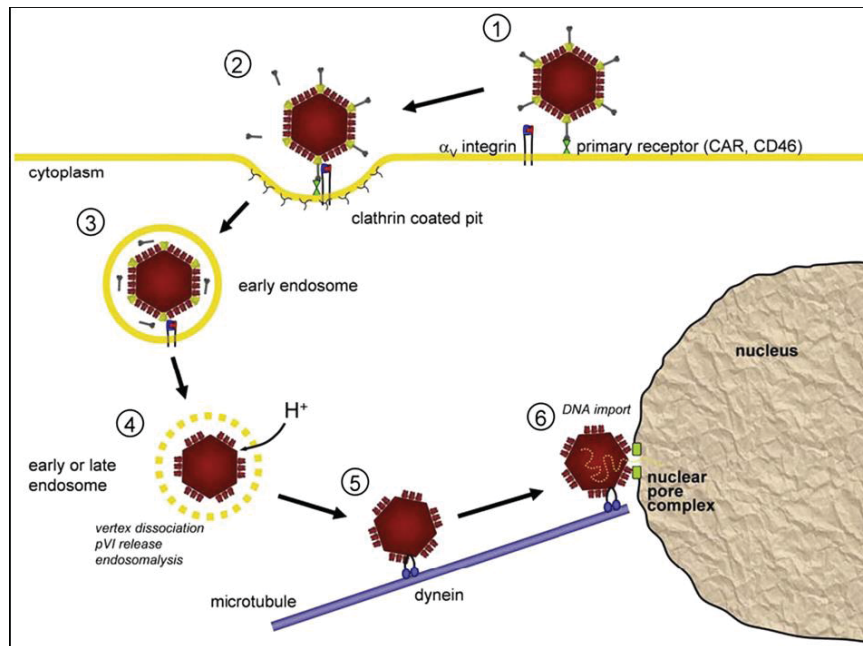


FIGURA 4 - A ENTRADA DO HAdV NA CÉLULA

NOTA: ETAPA 1: Interação da fibra com o receptor primário (exemplo: CAR ou CD46), seguido por endocitose mediada por clatrina na ETAPA 2, o que é facilitado pela interação do penton com  $\alpha_v$  integrinas. O virion dissocia-se no pH baixo, quando no início de sua estada no endossoma inicial (ETAPA 3), liberando a proteína pVI (ETAPA 4); a qual tem sido implicada na instabilidade da membrana endossomal, permitindo a fuga do virion do endossoma. O virion parcialmente desmontado é transportado pela proteína dineína ao longo do microtúbulo até o poro nuclear (ETAPA 5), onde o DNA viral é importado para o núcleo (ETAPA 6)

FONTE: NEMEROW *et al.* (2009)

A precisão dos eventos moleculares envolvidos na desmontagem do HAdV não é muito bem definida, mas acredita-se que a liberação da proteína pVI do capsídeo (ligada ao hexon), nesta fase, facilita a lise do endossomo, ou seja, a pVI tem atividade lítica, conduzindo à ruptura do endossomo, permitindo a entrada de partículas não revestidas no citoplasma (WIETHOFF *et al.*, 2005).

A proteína VI tem sido implicada na alteração da membrana endossomal, permitindo o escape do virion do endossomo (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009). Após o escape endossomal, as partículas do HAdV são parcialmente revestidas e associadas a microtúbulos motores, através da proteína dineína, a qual permite o transporte das partículas virais para o núcleo, ao longo dos microtúbulos (SUOMALAINEN *et al.*, 1999). Depois do trânsito do virion na célula, ocorre a liberação do ácido nucleico viral por meio do complexo do poro nuclear e subsequente replicação do DNA e produção/montagem de virions de HAdV no núcleo.

### 2.2.3 Composição do Genoma e Replicação Viral

O genoma dos HAdV é composto de dupla fita de DNA linear (BĚNKO, HARRACH, 2003) que apresenta oito regiões de transcrição que dependem da RNA polimerase II. Dessas regiões, cinco são de transcrição precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4) (E de *early*), duas de transcrição intermediária (pIX e pIVa2) e uma de transcrição tardia (MLTU – *Major Late Transcription Unit*) que processa os RNAm (L1, L2, L3, L4 e L5) (L de *late*). A Figura 5 exibe o esquema do genoma viral.

O DNA viral apresenta genes de RNA vírus associados (VA-RNA gene) que são transcritos pela RNA polimerase III, da célula hospedeira, dando origem a RNAs de fita dupla; denominados VA-RNA (RNA vírus associado) (KIDD, GRAWICZ, OBERG, 1995; MA, MATHEWS, 1996; KNIPE, HOWLEY, 2001). Dependendo do subgênero do HAdV, há possibilidade de encontrar uma ou duas sequências da região VA-RNA gene. Os subgêneros A, F e B:2 contêm apenas uma região VA-RNA gene (VA I), enquanto B:1, C e E possuem duas regiões (VA I e II) (KIDD, GRAWICZ, OBERG, 1995; MA e MATHEWS, 1996; KNIPE, HOWLEY, 2001). Os fragmentos VA-RNA I e VA-RNA II são os transcritos do gene VA-RNA contido no genoma viral. Esses transcritos são chamados de vírus associados. A função do VA-RNA I é se ligar à enzima proteína quinase dependente de RNA, antagonizando, assim, o seu efeito. Esse processo resulta no efeito abortivo do mecanismo de defesa antiviral induzido por Interferon (KATZE *et al.*, 1987; KNIPE, HOWLEY, 2001). Porém, a função da VA-RNA II permanece desconhecida.

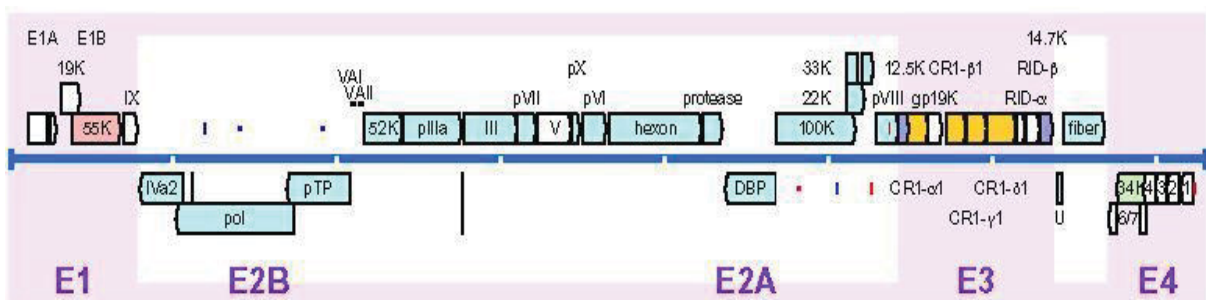


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS ADENOVÍRUS, SUAS REGIÕES DE TRANSCRIÇÃO E GENES

NOTA 1: Modelo: (HAdV-E)

NOTA 2: Dessas regiões, cinco são de transcrição precoce (E1A, E1B, E2A, E3 e E4), a região E2B é de transcrição intermediária (pIX, pIVa2, pol e pTP) e uma de transcrição tardia (MLTU – *Major Late Transcription Unit*) que processa os RNAm (VAI, VAII, pIIIa, III, pVII, V, pX, pVI, hexon e protease)

FONTE: DAVISON *et al.* (2003)

O ciclo de replicação é dividido em eventos iniciais e tardios. Os eventos iniciais ocorrem antes do início da síntese de DNA, induzindo a célula do hospedeiro a dar início à fase S (síntese) do ciclo celular, a fim de criar condições para a replicação viral. A modulação do ciclo celular é efetuada pelos produtos do gene E1A. A região E1B codifica proteínas que bloqueiam a morte celular (apoptose). As regiões E1A e E1B regulam a progressão do ciclo celular. Os genes tardios surgem com o início da síntese do DNA viral, e codificam as proteínas estruturais do vírus. E1B juntamente com E4 inibem o acúmulo citoplasmático de RNAm celular facilitando o aumento de RNAm viral (KATZE *et al.*, 1987).

A replicação do DNA, a transcrição e o amadurecimento do HAdV ocorrem no núcleo celular, dentro do qual há um acúmulo de proteínas estruturais, descritos como corpos de inclusão em exames histológicos, os quais estão presentes em células alveolares durante as pneumonias por este vírus (HIERHOLZER, 1991).

O processo de montagem viral ocorre no núcleo da célula infectada. A partícula madura torna-se estável, infecciosa e resistente a nucleases. O ciclo infeccioso do HAdV leva cerca de 24 horas. O sistema de montagem do vírus é ineficaz, visto que cerca de 80% dos capsômeros do hexon e 90% do DNA viral não são empregados (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009).

#### 2.2.4 Tipos de HAdV e Patogenia

Os HAdV têm sido associados com um amplo espectro de enfermidades clínicas. O Quadro 3 descreve algumas das características clínicas e epidemiológicas das principais doenças causadas pelos diferentes subgêneros do HAdV.

Os HAdV infectam células epiteliais do trato respiratório, gastrointestinal, olhos e com menor frequência células do trato urinário e fígado. A multiplicação dos vírus no organismo pode ocorrer na mucosa da faringe, conjuntiva ou mucosa intestinal, dependendo da porta de entrada no organismo (BAUM, 2005).

QUADRO 3 – DOENÇAS CAUSADAS POR ADENOVÍRUS HUMANO

DOENÇAS	IDADE	TIPOS COMUNS*	SUBGÊNERO PRINCIPAL	FONTE DE INFECÇÃO
<b>Infecções Respiratórias</b>				
Faringe	Criança	<b>1,2,3,5,6,7</b>	B, C	Garganta
Traqueobronquite	Adultos jovens	<b>3,4,7,14,21,55</b>	B, E	Garganta
Pneumonia	Criança	<b>1,2,3,4,5,7,21</b>	B, C	Garganta
	Adultos jovens	<b>4,7</b>	B, E	Garganta
<b>Infecções Oculares</b>				
Febre faringo-conjuntival	Criança	<b>1,2,3,4,6,7</b>	B, C, E	Garganta, olho
Ceratoconjuntivite epidêmica	Qualquer idade	<b>8,19,37,53,54, 56</b>	D	Olho
<b>Infecções Genitourinárias</b>				
Cervicites, uretrites	Adulto	<b>19,37</b>	D	Secreção genital
Cistite hemorrágica	Criança	<b>11,21</b>	B	Urina
<b>Infecções entéricas</b>				
Gastroenterites	Criança	<b>31,40,41,52</b>	A, F,G	Fezes
<b>Infecções em imunocomprometidos</b>				
Encefalites, pneumonia	Qualquer idade,	<b>7,11,34,35</b>	B	Urina, pulmão
	SIDA			
Gastroenterites	SIDA	D, + 43 e 47	D	Fezes
Generalizadas	SIDA	2,5	C	Sangue

FONTE: Adaptado de SANTOS, ROMANOS, WIGG (2008); RABONI *et al.* (2003); FEIGIN e CHERRY, (1998); HIERHOLZER, (1992)

NOTA: \*em destaque os sorotipos mais encontrados nas infecções

Muitas infecções por HAdV são subclínicas e o vírus pode persistir no hospedeiro durante meses (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009).

Os subgêneros A e F causam infecções entéricas e o subgênero D a ceratoconjuntivite e infecções genitourinárias (KOJAOGHLANIAN, FLOMENBERG, HORWITZ, 2003; SEGERMAN *et al.*, 2003). Porém, o subgênero D tipos 29 e 30 podem causar infecção do trato respiratório superior, com sinais e sintomas de coriza, faringite e febre. Subgêneros C, E e B infectam o trato respiratório, porém alguns tipos do subgênero B também causam infecção do trato urinário (SETO *et al.*, 2009).

O HAdV está associado aos casos graves de IRA. Fatores como genótipo e

carga viral, resposta imune do hospedeiro e influências do meio ambiente podem estar relacionadas à gravidade da doença (LARRAÑAGA *et al.*, 2000). As manifestações clínicas graves e fatais acometem principalmente crianças pequenas, com idade inferior a cinco anos. Os tipos mais frequentemente correlacionados com maior gravidade são do subgênero B:1, tipos 3, 7 e 21, bem como do subgênero C, tipos 1, 2, 5 e 6 (WADELL, 1988; OGAWA *et al.*, 2004; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2006).

Na América do Sul, um estudo de genotipagem das cepas de HAdV, realizado no Chile ao longo de vários anos (1980 a 1996), mostrou que o subgênero B, tipo 7, foi o agente infeccioso na maioria dos casos fatais (LARRAÑAGA *et al.*, 2000).

No estudo de Gray (2006), os tipos de HAdV mais prevalentes foram 3, 2, 1, 5 e 21. Sendo que 50% dos pacientes estavam hospitalizados, 7,4% estavam na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e 4,2% com diagnóstico de câncer, 19,6% apresentavam doença crônica, 11% realizaram transplante de medula óssea ou órgão sólido. Os casos mais graves ocorreram em pacientes com idade inferior a sete anos, ou para aqueles que apresentavam doença crônica ou tinham realizado transplante recente. Em geral, crianças não imunocomprometidas com idade inferior a sete anos apresentaram infecção do trato respiratório pelo tipo 3, e a gravidade da doença foi menor. No entanto, crianças com infecções mais graves por HAdV foram aquelas que apresentaram fatores de risco como internamento em UTI, tempo maior de hospitalização, doença de base e estavam infectadas pelos HAdV tipos 5 ou 21.

O HAdV tipo 7 apresenta associação com grave morbidade; em todo o mundo, este tipo causa epidemias e doenças graves como bronquiolite e pneumonia (LARRAÑAGA *et al.*, 2000; ERDMAN *et al.*, 2002). Os tipos 5 e 21 estão associados a epidemias, doenças graves e óbitos (CHATTERJEE *et al.*, 2000; SHULT *et al.*, 1991). As infecções pelo tipo 3 também podem ter uma evolução grave ou mesmo fatal. As infecções respiratórias pelos tipos 3 e 7 não podem ser distintas clinicamente, embora o tipo 7 pareça estar relacionado com maior número de infecções fatais (SCHMITZ, WIGARD, HEINRICH, 1983).

As infecções do baixo trato respiratório pelos HAdV caracterizam-se por estar associadas com maior gravidade, nestas, os HAdV replicam e levam a alterações histológicas que podem ser divididas em duas fases: uma fase inicial (que afeta alvéolos, epitélio bronquiolar e regiões peribronquiolar), com um infiltrado

que consiste principalmente de macrófagos, neutrófilos e poucos linfócitos; e uma fase posterior (que afeta as regiões peribronquiolar e perivascular), com um infiltrado composto quase exclusivamente de linfócitos. Em ambas as fases, o processo predominante é a resposta do hospedeiro à infecção, ao invés de danos virais diretamente às células infectadas (PRINCE *et al.*, 1993; HAYWARD, 2004).

### 2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O HADV

O diagnóstico laboratorial constitui-se em instrumento essencial para determinar a distribuição das viroses mais comuns relacionadas às infecções respiratórias em crianças (COSTA *et al.*, 2006).

Para identificação do vírus podem ser utilizados métodos que identifiquem a partícula viral (isolamento em cultura e microscopia eletrônica), o antígeno e (ou) anticorpo (imunofluorescência e ensaio imunoenzimático) e o material genético (reação em cadeia da polimerase (PCR), *nested* PCR e RFLP, *multiplex* PCR, PCR em tempo real, restrição enzimática e sequenciamento). Hoje, há uma grande variedade de testes diagnósticos para a detecção viral, em particular, testes genéticos, no presente estudo serão abordados os métodos acima referidos.

Em geral, os testes rápidos para detecção dos antígenos de vírus respiratórios têm sido pouco sensíveis, porém a sensibilidade depende do vírus que está sendo pesquisado, o paciente pode estar na “*janela imunológica*”, intervalo entre o início da infecção e a não detecção dos anticorpos pelos métodos sorológicos (FALSEY, WALSH, 2006). A cultura em células e o teste de imunofluorescência, quando associados, são eficientes para detectar os agentes respiratórios virais mais prevalentes. Alguns fatores concorrem para algumas dificuldades: utilização de uma técnica apenas, atraso do momento de coleta da secreção, tipo e local do material coletado, escolha do método ou associação de métodos (CUBIE *et al.*, 1992). Para o HAdV, os métodos mais indicados são a cultura em células, o teste de imunofluorescência (IF) (apesar de apresentar baixa sensibilidade) e também a amplificação de ácidos nucleicos por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (LARRAÑAGA *et al.*, 2000).

### 2.3.1 Isolamento em Cultura Celular

O isolamento do HAdV pode ser feito com diversas linhagens celulares, entre elas podemos citar as células A549 (células epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano) e HEK 293 (células embrionárias de rim humano) (KO, CROMEANS, SOBSEY, 2003).

Comumente, para este estudo, as amostras clínicas de aspirado de nasofaringe (ANF) foram inoculadas em uma linhagem celular denominada HEp-2, derivada de carcinoma epidermóide da laringe humana, permissiva a outros vírus respiratórios, além do HAdV, como o RSV. Para esta linhagem celular, após três a cinco semanas é observado o efeito citopático (ECP). Esse efeito consiste em alterações morfológicas produzidas devido à replicação viral e são visíveis ao microscópio óptico.

Algumas desvantagens do isolamento em cultura celular incluem: há necessidade de uma infraestrutura bem definida a fim de que não ocorra contaminação das amostras e dos meios de cultivo (TARJA *et al.*, 1998); no que se refere às amostras respiratórias, devem ser coletadas com *swab*, colocadas em solução salina tamponada ou meio de cultura, para evitar que ressequem com a consequente desnaturação dos vírus; o transporte deve ser feito sob refrigeração e as amostras devem ser assim conservadas até o momento do diagnóstico, para evitar a inativação dos vírus pelo calor; antes da inoculação em culturas celulares, devem ser processadas adequadamente, para eliminação de resíduos indesejáveis e descontaminação com agentes antibacterianos e (ou) antifúngicos, visando prevenir que resíduos tóxicos ou micro-organismos contaminantes interfiram no desenvolvimento do ECP; há necessidade de uma quantidade suficiente de vírus, na amostra clínica, para o desenvolvimento do ECP; o cultivo celular não permite a identificação final, mas possibilita que técnicas adicionais possam ser utilizadas para identificar o vírus isolado. Em relação à técnica, esta requer tempo para o desenvolvimento do vírus em questão, sendo analisado o ECP somente de três a cinco semanas após o inóculo em cultura (essa demora na obtenção dos resultados restringe a sua aplicação). O isolamento viral necessita de partículas viáveis para o sucesso do isolamento (SHIN *et al.*, 2004), no caso do HAdV .

Algumas vezes, as culturas celulares que estão sendo acompanhadas, mas que não apresentam nenhum ECP dentro dos primeiros sete dias, têm as células

raspadas para serem, uma vez mais, inoculadas em novos tubos, com o mesmo tipo de linhagem celular, com objetivo de aumentar a possibilidade de isolamento viral.

De um modo geral, as vantagens das culturas celulares compreendem boa especificidade e alta sensibilidade, mas é de grande propriedade verificar a permissividade da célula em cultura para o vírus a ser pesquisado. As células para cultivo podem ser mantidas no laboratório mediante repiques sucessivos, além de permitir a preservação do vírus para estudos adicionais (SEADI *et al.*, 2002) e diminuir o uso de animais de laboratório utilizados para fins diagnósticos (PAMPALONI *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Microscopia Eletrônica

Os vírus, por serem partículas pequenas, são vistos somente por microscopia eletrônica a qual assegura diagnóstico de infecções virais e permite a observação do comportamento das interações que ocorrem entre vírus e célula hospedeira. Apresenta utilidade na investigação de agentes virais desconhecidos; porém está sendo substituída por técnicas mais sensíveis como a PCR (ROINGEARD, 2008).

A microscopia eletrônica apresenta as seguintes vantagens: permite a identificação da família do vírus por aspectos morfológicos e estruturais, características importantes para diferenciar os vírus; é útil para detectar vírus de difícil cultivo; permite observar mais de um agente numa mesma amostra; além de proporcionar o estudo das relações entre os vírus e componentes estruturais das células que infectam (HARFORD *et al.*, 1956; UEDA *et al.*, 1995).

Dentre as suas desvantagens estão: a impossibilidade de se realizar exames em larga escala; o seu alto custo; a manutenção do equipamento que requer grande despesa; a necessidade de técnicos especializados. Devido a esses aspectos, é uma técnica mais utilizada em pesquisa do que em rotina laboratorial (UEDA *et al.*, 1995).

A aplicação da microscopia eletrônica de transmissão em conjunto com a imunomarcação está sendo vantajosa; com o desenvolvimento da imunodeteção, o uso de sondas para a microscopia eletrônica está permitindo alta resolução nos estudos estruturais (BOISVERT *et al.*, 2000; GOLDMAN *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2002).

### 2.3.3 Imunofluorescência

A pesquisa de antígenos envolve técnicas que permitem a detecção de proteínas virais expressas em células infectadas. Para isso, é utilizada imunofluorescência direta (IFD), indireta (IFI) e (ou) a técnica de ensaio imunoenzimático (EIE). A especificidade dessas técnicas é de 95 a 98% em geral. A sensibilidade é inconstante segundo o vírus a ser identificado, que, para o HAdV, varia de 25% a 75%, dependendo do anticorpo monoclonal utilizado (TARJA *et al.*, 1998).

A IF consiste na conjugação de anticorpos ou de antígenos com substância fluorescente. As substâncias fluorescentes (fluorocromo) mais empregadas são o isotiocianato de fluoresceína e o isotiocianato de rodamina (LIMA *et al.*, 1992). A pesquisa de antígenos virais por IF possibilita a identificação específica do patógeno.

Na IFD, o anticorpo marcado (conjugado) é adicionado e se fixa ao antígeno, formando um imunocomplexo estável, e o conjugado não ligado é removido por lavagens. Depois disso, a lâmina é visualizada em microscopia de fluorescência (AOKI *et al.*, 2010).

A IF pode ser utilizada para pesquisa direta do antígeno na amostra clínica ou em cultivo celular. A técnica de IFI leva a um diagnóstico rápido para o diagnóstico das infecções virais respiratórias apresentando boa sensibilidade, com custos razoáveis, a desvantagem é que apresenta baixa reprodutibilidade para o HAdV (MADELEY, PEIRIS, 2002; LARRAÑAGA *et al.*, 1990). Apesar disso, fica a tarefa de se complementar o estudo com a utilização de técnicas moleculares.

No estudo de Pujol *et al.* (2005), ao utilizarem a técnica de IFD em conjunto com o isolamento em cultura, os vírus foram detectados em 13 a 45% das crianças com sintomas de doença respiratória.

Dentre as vantagens da IF estão: o rápido diagnóstico; sistemas diferentes podem fazer uso do mesmo conjugado e a simplicidade de padronização e execução da metodologia.

As desvantagens da IF envolvem: a baixa sensibilidade dos métodos rápidos para a identificação do HAdV (TARJA *et al.*, 1998). Além disso é um método que apresenta subjetividade na leitura e necessidade de técnicos treinados para a leitura das lâminas (SYRMIS *et al.*, 2004; TEMPLETON *et al.*, 2005).

As técnicas de imunofluorescência ainda fazem parte da rotina laboratorial, porém, devido às desvantagens, podem vir a ser substituídas por outras técnicas que apresentem maior sensibilidade e reprodutibilidade.

#### 2.3.4 Ensaio Imunoenzimático (EIE)

O EIE é o método mais utilizado em laboratórios, a reação é visualizada devido à coloração formada na cavidade da microplaca.

As vantagens desta técnica são: método rápido; alta sensibilidade e especificidade (depende do vírus pesquisado); o analista não se expõe aos riscos da radiação; há objetividade na leitura e é uma técnica que permite automatização (STITES, STOBO, WELLS, 1987).

Entre as desvantagens estão: variáveis relacionadas com o momento de obtenção da amostra no curso da infecção; e o fato do método de coleta e preparação de amostras poder interferir na sensibilidade de detecção (STITES, STOBO, WELLS, 1987). Através dessa metodologia o antígeno do HAdV pode ser pesquisado em diversas amostras: urina, fezes e sobrenadante de cultura. A pesquisa de anticorpos contra HAdV não tem utilidade do ponto de vista clínico, devido a isso não é realizada a sua sorologia, pelo fato de apresentar melhor rendimento quando executada em até 48 horas do início dos sintomas (MADELEY, PEIRIS, 2002).

#### 2.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Este método apresenta maior sensibilidade e especificidade do que a imunofluorescência indireta, para os diferentes agentes virais associados a infecções agudas do trato respiratório.

O cálculo preciso da sensibilidade clínica de um ensaio de PCR é dificultado pela falta de um "padrão ouro" de diagnóstico adequado para a maioria das infecções (WILSON, 1997). Deve-se portanto ter cautela, pois na interpretação dos resultados um aumento de sensibilidade pode originar falso-positivos ou resultados sem relevância clínica.

O estudo de Weinberg *et al.* (2004) relata que os ensaios de PCR convencional dobraram a taxa de detecção de seis diferentes espécies de vírus

respiratórios em relação à cultura, quando analisadas em amostras clínicas de crianças com idade inferior a cinco anos hospitalizadas devido a infecções respiratórias agudas.

Em relação à PCR, a sensibilidade pode ser afetada pela presença de inibidores nas amostras, geralmente os de natureza desconhecida, que causam resultados falso-negativos (WILSON, 1997). Os pequenos volumes de amostras clínicas utilizadas também podem reduzir a sensibilidade, o que pode ser melhorado aumentando o volume da amostra na preparação da reação ou concentrando a amostra (MURDOCH *et al.*, 2003).

O risco de resultados falso-positivos na PCR é um grande problema em decorrência de sua extrema sensibilidade, mas pode resultar também da amplificação de micro-organismos que apresentam o genoma semelhante ao organismo alvo. Estes achados falso-positivos podem ser evitados pelo uso de controles adequados e boas práticas laboratoriais para evitar a contaminação (MURDOCH *et al.*, 2003).

A PCR parece superar as dificuldades dos métodos tradicionais, apresentando melhor sensibilidade e menor tempo de diagnóstico (TALBOT, FALSEY, 2010).

#### 2.3.5.1 *Nested* PCR e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Sensibilidade e especificidade também podem ser influenciadas pelo tipo de ensaio de PCR. A *nested* PCR geralmente é mais sensível do que a PCR de etapa única, mas há um aumento do risco de contaminação para a *nested* PCR, porque os tubos de reação precisam ser abertos após a primeira amplificação para adicionar reagentes à segunda PCR.

Uma sofisticação das técnicas de diagnóstico molecular é a tipagem molecular que, além de indicar a presença do patógeno no material biológico, permite a caracterização genotípica de HAdV pode ser realizada a técnica de perfis de tamanho de fragmentos gerados por restrição enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP). Nesta técnica, o DNA viral é extraído e as variações, ao longo do genoma do HAdV, podem ser observadas (WADELL *et al.*, 1984). Isto possibilita avaliação refinada, ou seja, a técnica de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e

posterior separação, por eletroforese, dos fragmentos produzidos, resultando assim padrões de restrição específicos. Estes padrões podem ser característicos ao nível das espécies ou mesmo ao nível da estirpe. Uma vez que estirpes distintas apresentam diferenças (ainda que, por vezes, mínimas) ao nível do genoma, o que esta técnica explora é a possibilidade dessas diferenças se encontrarem no interior da sequência de reconhecimento da(s) enzima(s) de restrição utilizada(s) (NARIHIRO, SEKIGUCHI, 2007).

#### 2.3.5.2 *Multiplex* PCR

*Multiplex* PCR pode amplificar várias sequências-alvo no tubo de reação, porém, geralmente são menos sensíveis do que os ensaios de PCR para detectar apenas um alvo. A especificidade da *multiplex* PCR também pode ser reduzida se as temperaturas de hibridização para os diversos pares de oligonucleotídeos iniciadores não forem idênticas.

A detecção do produto amplificado da PCR pode também ter sua sensibilidade aumentada quando se faz uso de hibridização com sondas específicas, fluorescência, ou ensaio imunoenzimático. Isso garante um aumento da sensibilidade, em comparação com a visualização padrão de produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose (MURDOCH *et al.*, 2003).

#### 2.3.5.3 PCR em Tempo Real

Esta tecnologia combina a amplificação de ácidos nucleicos com a rápida detecção dos *amplicons*, fornecendo resultados em pouco tempo se comparada à PCR convencional, apresentando maior sensibilidade, além de permitir quantificação e detecção de múltiplos patógenos em uma única amostra clínica (COCKERILL, 2003).

No estudo de Kuypers *et al.* (2006), os ensaios de PCR em tempo real foram significativamente mais sensíveis do que a imunofluorescência (IF) para a detecção de vírus respiratórios em amostras clínicas de crianças, com um incremento de 40% na positividade para estes vírus. A PCR também identificou amostras em coinfeções virais em uma frequência 10 vezes maior que a imunofluorescência; isso aconteceu pelo fato de a maioria das amostras apresentar um número muito

baixo de vírus para detecção de HAdV por IF, ou também, a possibilidade de que um número baixo de cópias de HAdV não cause doença, mas indique a presença persistente do vírus. Informações sobre a gravidade e a duração da doença em crianças HAdV positivas podem ajudar a interpretar os resultados (MOURA *et al.*, 2003).

#### 2.3.6. Sequenciamento e Análise Filogenética

Os recentes avanços no sequenciamento de genes de HAdV têm permitido distinguir as infecções causadas por diversos sorotipos de HAdV utilizando técnicas de restrição enzimática, para tipagem genômica (SAITOH-INAGAWA *et al.*, 1996).

A análise filogenética demonstra sequências determinantes da divergência genética de todos os 56 HAdV propondo critérios de classificação molecular. Estes critérios podem também facilitar a identificação de novos protótipos de HAdV (MADISCH *et al.*, 2005).

Os HAdV vêm sendo utilizados como vetores de vacinação e empregados na tecnologia da terapia genética (BELOUSOVA *et al.*, 2002).

## 2.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As IRA por HAdV podem ocorrer em qualquer época do ano, porém são mais frequentemente observadas no final do inverno, primavera e início do verão (LÓPEZ, MARTÍNEZ, 2007).

Descoberta recente tem revelado que dados epidemiológicos e clínicos estão relacionados a alterações na apresentação antigênica, virulência e distribuição geográfica do HAdV (GRAY *et al.*, 2006).

Os vírus respiratórios são reconhecidos como sendo os mais frequentes patógenos do trato respiratório inferior em lactentes e crianças em países desenvolvidos, mas são menos diagnosticados em populações de países em desenvolvimento (VIEIRA *et al.*, 2001).

A utilização na rotina laboratorial de testes diagnósticos específicos para agentes virais em caso de IRA é limitada, devido a problemas financeiros e técnicos ou ainda devido ao fato de os vírus serem subestimados como agentes de infecções

respiratórias que necessitam de hospitalização (MOURA *et al.*, 2003; MAHONY *et al.*, 2009).

Contudo, apesar de as IRA serem causas importantes de morbidade e mortalidade em crianças em todo o mundo, apresentam um maior impacto em países em desenvolvimento, onde as infecções respiratórias agudas baixas constituem uma importante causa de morte em crianças de até cinco anos (HAZLETT, 1988). Nas crianças com menos de dois anos, 70 a 90% das infecções respiratórias são de origem viral e, embora o HAdV represente 2 a 5% deste total, sua importância reside na elevada letalidade e seu vínculo com surtos intra-hospitalares (DALMÁS *et al.*, 2003).

No Brasil, as IRA e as doenças diarreicas são as principais causas de mortalidade em crianças com menos de cinco anos de idade, sendo que as pneumopatias agudas são responsáveis por 11% das mortes em crianças com idade inferior a um ano de idade, e por 13% na faixa etária entre um e quatro anos (RODRIGUES, SILVA, BUSH, 2002). Particularmente, alguns estudos realizados em diferentes áreas geográficas têm revelado os agentes virais como a principal causa de IRA, principalmente em crianças, como demonstrado na cidade do Rio de Janeiro (NASCIMENTO *et al.*, 1991), São Paulo (MYIAO *et al.*, 1999) e Curitiba (TSUCHIYA *et al.*, 2005). Entretanto, informações sobre a prevalência dos vírus em crianças de algumas regiões brasileiras ainda são escassas, assim como as informações disponíveis sobre sazonalidade (Dos SANTOS, CARDIAS, MELLO, 1997; STRALIOTTO *et al.*, 2004).

Os HAdV encontram-se distribuídos em todo o mundo. Os diversos sorotipos causam diferentes doenças em distintos grupos etários, e a gravidade varia nas diferentes áreas geográficas. As infecções são em geral autolimitadas e as características clínicas da doença dependem tanto do hospedeiro como do sorotipo envolvido. Aproximadamente 65% dos isolamentos de HAdV provêm de crianças menores de quatro anos (HIERHOLZER, 1991).

O HAdV é cada vez mais reconhecido como um importante patógeno em crianças submetidas a transplante de medula óssea e imunocomprometidas, sendo as características estruturais do HAdV também importantes para o desenvolvimento da doença (RUSSELL, 2009).

É relevante destacar que um único sorotipo pode provocar diferentes doenças clínicas, no entanto, mais de um tipo pode causar a mesma doença clínica.

Os HAdV 1 a 7 são os mais comuns em todo o mundo, sendo responsáveis pela maioria dos casos de doenças relacionadas ao HAdV (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009).

O HAdV pode infectar uma grande variedade de tecidos, mas a sua propensão para produzir doença é normalmente bem definida. Em geral, os HAdV infectam seus hospedeiros na conjuntiva ocular, mucosa respiratória ou mucosa digestiva (NEMEROW *et al.*, 2009; RUSSELL, 2009). O período de incubação é curto, variando de cinco a 10 dias (LEITE, 1994). Dados sobre a presença e duração da viremia por HAdV em pacientes imunocompetentes não estão disponíveis (ABERLE *et al.*, 2003). A maioria das infecções é subclínica. Os sorotipos 1, 2 e 5 podem persistir nas amígdalas durante anos, sem desencadear sintomas clínicos (LEITE, 1994).

Os HAdV são vírus estáveis que podem ser recuperados de amostras clínicas com relativa facilidade. O ANF (aspirado de nasofaringe), os raspados nasais e o material de biópsia ou necrópsia, são amostras adequadas para seu isolamento.

A detecção do vírus pode ser considerada um sinal de infecção recente e está frequentemente associada à doença sintomática. A infecção por HAdV que resulta em quadros respiratórios inicia-se no epitélio da faringe, porém, o processo inflamatório pode alcançar os brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar, cuja resolução demora até quatro semanas (ANDREW, DAY, Mc GREGOR, 1998). A infecção do epitélio da faringe leva para uma fase virêmica (começo do curso da doença), antes do aparecimento dos sintomas. Esta fase pode persistir de dias a anos. Não se sabe ao certo por que alguns doentes adquirem o vírus e permanecem assintomáticos. O curso da doença é autolimitado na quase totalidade dos casos. Entretanto, a gravidade da doença respiratória pode variar de leve a grave, com pneumonite e insuficiência respiratória (HOWARD *et al.*, 1999). Pneumonia ocorre entre 10 e 20% dos casos. No início da doença pode ser observada leucocitose com leve predomínio de polimorfonucleares. O HAdV sorotipo 7 é reconhecido por desencadear doença grave em crianças e pode produzir sequelas pulmonares, tais como bronquiectasias e hiperinsulflação pulmonar crônica bilateral. Pneumonia grave por HAdV tem sido associada com imunossupressão, infecção viral concomitante ou desnutrição grave recente (ANDREW, DAY, Mc GREGOR, 1998).

Os HAdV que infectam predominantemente o trato respiratório superior pertencem ao subgênero C. Este subgênero, juntamente com os subgêneros B e E, que infectam o trato respiratório inferior, evidenciam o amplo espectro clínico da doença, com quadros que variam de faringite leve à doença respiratória aguda (HAYASHI, HOGG, 2007).

Rinorreia, sibilância, vômitos e diarreia, pneumonia, atelectasia e infiltrado intersticial são significativamente mais frequentes nos recém-nascidos com infecção viral. Foi observado por Diniz *et al.*, em 2005, que, embora a maioria das infecções virais do trato respiratório inferior tenha um curso favorável, alguns pacientes apresentam evolução grave com manifestações clínicas prolongadas, especialmente quando existe infecção concomitante, por bactérias ou fungos.

É difícil distinguir clinicamente a infecção por HAdV de outras infecções respiratórias virais ou bacterianas (LÓPEZ-CAMPOS *et al.*, 2007). Este fato indica que são necessários métodos microbiológicos e virológicos para detectar as doenças respiratórias agudas causadas por HAdV e determinar os tipos envolvidos. Métodos de diagnóstico rápido podem evitar tratamento inadequado com antibióticos e monitorar o controle de transmissão do HAdV, especialmente no âmbito hospitalar. Portanto, o diagnóstico laboratorial eficiente de doenças infecciosas causadas por HAdV se mostra cada vez mais importante para a condução clínica e saúde pública (GRONDAHL *et al.*, 1999).

Segundo Piedra (2005), os HAdV mais comuns da infância são os tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, os quais também infectam cerca de 85% dos idosos e lactentes. Em crianças com idade inferior a seis meses a frequência destes tipos é menor. Dados sugerem que os anticorpos para HAdV, sorotipo específicos, adquiridos em fase intrauterina por via transplacentária protegem o recém-nascido. A infecção sistêmica por HAdV deve ser considerada quando há quadro de pneumonia, hepatite, sintomas neurológicos e coagulopatia intravascular disseminada, bem como o desenvolvimento de trombocitopenia, cujas culturas bacterianas são negativas. É possível a transmissão horizontal da mãe ou por contato de outras pessoas logo após o nascimento, mas também pode ocorrer transmissão vertical (RIEGER-FACKELDEY, AUMEIER, GENKEL-BOROVICZÉNY, 2000).

São descritas sequelas de dano pulmonar residual importante como bronquiectasia e bronquiolite obliterante (BECROFT, 1979) decorrentes da infecção por HAdV. Alguns tipos podem causar também uma síndrome clínica tipo *pertussis*

que não pode ser diferenciada daquela de etiologia bacteriana, salvo mediante a detecção do agente viral ou bacteriano (HIERHOLZER, 1989).

Frequentemente, na prática pediátrica, há dificuldade de discriminar quadros de infecções de vias aéreas inferiores de crises asmáticas. Por outro lado, não é incomum que os quadros infecciosos de vias aéreas alta ou baixa, especialmente os virais, sejam responsáveis por exacerbações de asma (ALDOUS *et al.*, 1996).

Dessa forma, observa-se na literatura uma variedade de expressões na definição das condições respiratórias agudas em lactentes. Expressões como “doença respiratória baixa”, (ALDOUS *et al.*, 1996) “doença do trato respiratório inferior”, “doença respiratória baixa sibilante” ou “doença respiratória aguda baixa” (PRIETSCH *et al.*, 2002) são vistas com certa frequência. Essas expressões também denotam a dificuldade de separar a asma de outras condições respiratórias agudas, incluindo quadros infecciosos, que cursam nesse grupo etário com sibilância (MACEDO *et al.*, 2007).

Crianças devem receber assistência respiratória mecânica quando apresentarem hipoxemia grave, apneia ou fadiga, resultante de prolongada insuficiência respiratória. Podem ocorrer atelectasias persistentes, anormalidades na função pulmonar, bronquiectasia, bronquiolite obliterante em infecção pulmonar crônica por HAdV (MISTCHENKO *et al.*, 1994).

Altos níveis séricos de Interleucina 6 (IL-6) foram associadas com picos de hipertermia (até 39°C), episódios de obstrução brônquica, sibilos, insuficiência respiratória, alteração na perfusão periférica e edema, quer generalizado ou limitado às pálpebras. Hepatomegalia também foi encontrada, bem como manifestações neurológicas tais como convulsões e estado epiléptico. Porém, hipotermia ou instabilidade térmica, angústia respiratória, síndrome de Reye e (ou) choque séptico foram encontrados em pacientes nos quais a IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) apresentavam níveis elevados. Além disso, níveis elevados dessas citocinas correlacionam-se com muitas das características clínicas que fazem a doença causada por HAdV difícil de ser distinguida de uma infecção bacteriana invasora (MISTCHENKO *et al.*, 1994).

A maioria dos pacientes tem uma evolução favorável, com melhora lenta da função pulmonar e da necessidade de oxigênio suplementar. Alguns pacientes evoluem com piora progressiva da hipoxemia e retenção de CO<sub>2</sub>, levando à hipertensão pulmonar e *cor pulmonale* (TEPER, FISCHER, JONES, 2002).

Em geral, os sintomas observados na infecção por HAdV são dependentes do sorotipo infectante, órgão(s) alvo afetado(s) e a agressividade está inversamente relacionada com o estado imune do hospedeiro (BERNAOLA, LUQUE, 2002).

O comprometimento ocular leve pode fazer parte das síndromes faringoespiratórias causadas por HAdV e está associada aos tipos 3 e 7. A recuperação da conjuntivite é completa, sem deixar sequelas. Porém pode ocorrer a ceratoconjuntivite, que é uma doença mais grave e ocorre principalmente em adultos sendo altamente contagiosa. É causada geralmente pelos tipos 8, 19 e 37 (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2009).

Os HAdV são agentes muito estáveis, isso facilita a disseminação hospitalar pela secreção das vias respiratórias, via fecal-oral, gotas, superfícies contaminadas, mãos contaminadas, equipamentos ou soluções oftalmológicas (PIEDRA, 2005).

#### 2.4.1 Fatores de Risco

Vários fatores de risco contribuem para a incidência e (ou) gravidade das pneumonias em crianças como prematuridade, desnutrição, baixo nível socioeconômico (BOHLAND, JORGE, 1999; POST *et al.*, 1992), tabagismo passivo (BOHLAND, JORGE, 1999; PRIETSCH *et al.*, 2002), frequência a creches (condições ambientais inadequadas), incluindo aglomeração familiar (PRIETSCH *et al.*, 2002), condições precárias de higiene, poluição do ar (SUARA, GLEZEN, 1995) e ausência de aleitamento materno (BERMAN, 1991). Doenças de base, especialmente aquelas que afetam os sistemas cardiopulmonar, imunológico ou neuromuscular também aumentam o risco para desenvolvimento de quadros mais graves (BOHLAND, JORGE, 1999). Em algumas situações é difícil distinguir as condições respiratórias agudas entre lactentes.

As epidemias de pneumonia viral seguem padrões sazonais previsíveis que podem facilitar estudos epidemiológicos e adequada intervenção. As epidemias ocorrem mais frequentemente durante o tempo do ano que apresenta baixa temperatura, umidade iminente ou chuva (SUARA, GLEZEN, 1995).

A poluição do ar surge como um importante fator de risco para IRA. Em muitos países em desenvolvimento, além de um aumento da quantidade de fumaça do tabaco, muitas casas contêm altos níveis de combustão de biocombustíveis, tais como madeira, para cozimento ou aquecimento, normalmente sem chaminé e (ou)

com pouca ventilação. Estes apresentam efeitos tóxicos não carcinogênicos. Em suma, o fumo e o biocombustível são prováveis fatores de IRA (PANDEY *et al.*, 1989).

A prematuridade está também associada com um risco aumentado de asma. Estes resultados são consistentes em alguns (JAAKKOLA *et al.*, 2006), embora não em todos (YUAN *et al.*, 2002) os estudos anteriores. A associação da asma com a prematuridade tem sido explicada pelo fato de que a prematuridade provoca redução do crescimento do pulmão e do calibre das vias aéreas, e isto pode aumentar o risco de sintomas respiratórios durante infecções e, por sua vez, aumentar a ocorrência da asma (JAAKKOLA *et al.*, 2006). A prematuridade pode, portanto, predispor a criança às infecções das vias respiratórias, o que reforçaria ainda mais esta associação. No entanto, o cuidado deve ser tomado ao se interpretar os resultados, pois é mais difícil distinguir a asma da doença pulmonar crônica da infância causada por prematuridade (METSÄLÄ *et al.*, 2008).

Não existem medicamentos antivirais para combater o adenovírus; o tratamento é sintomático.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal realizado no Laboratório de Virologia da Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD) do Serviço de Análises Clínicas do HC (Hospital de Clínicas), com amostras armazenadas de ANF de pacientes hospitalizados no HC-UFPR com infecção respiratória aguda durante os anos de 1996 a 2008.

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. Os Formulários de Coleta de dados clínicos, laboratoriais e diagnóstico das crianças infectadas por HAdV estão apresentados nos Apêndices I e II.

Este trabalho laboratorial foi realizado no período de outubro de 2007 a março de 2011.

#### 3.2 CASUÍSTICA

O desenvolvimento do trabalho de diagnóstico laboratorial foi realizado em duas etapas, representadas no fluxograma a seguir:

- Primeira etapa: foram analisadas amostras dos anos de 1996 a 2007;
- Segunda etapa: foram analisadas amostras do ano de 2008.

A Figura 6 apresenta a obtenção das 33 amostras que constituíram a casuística deste estudo.

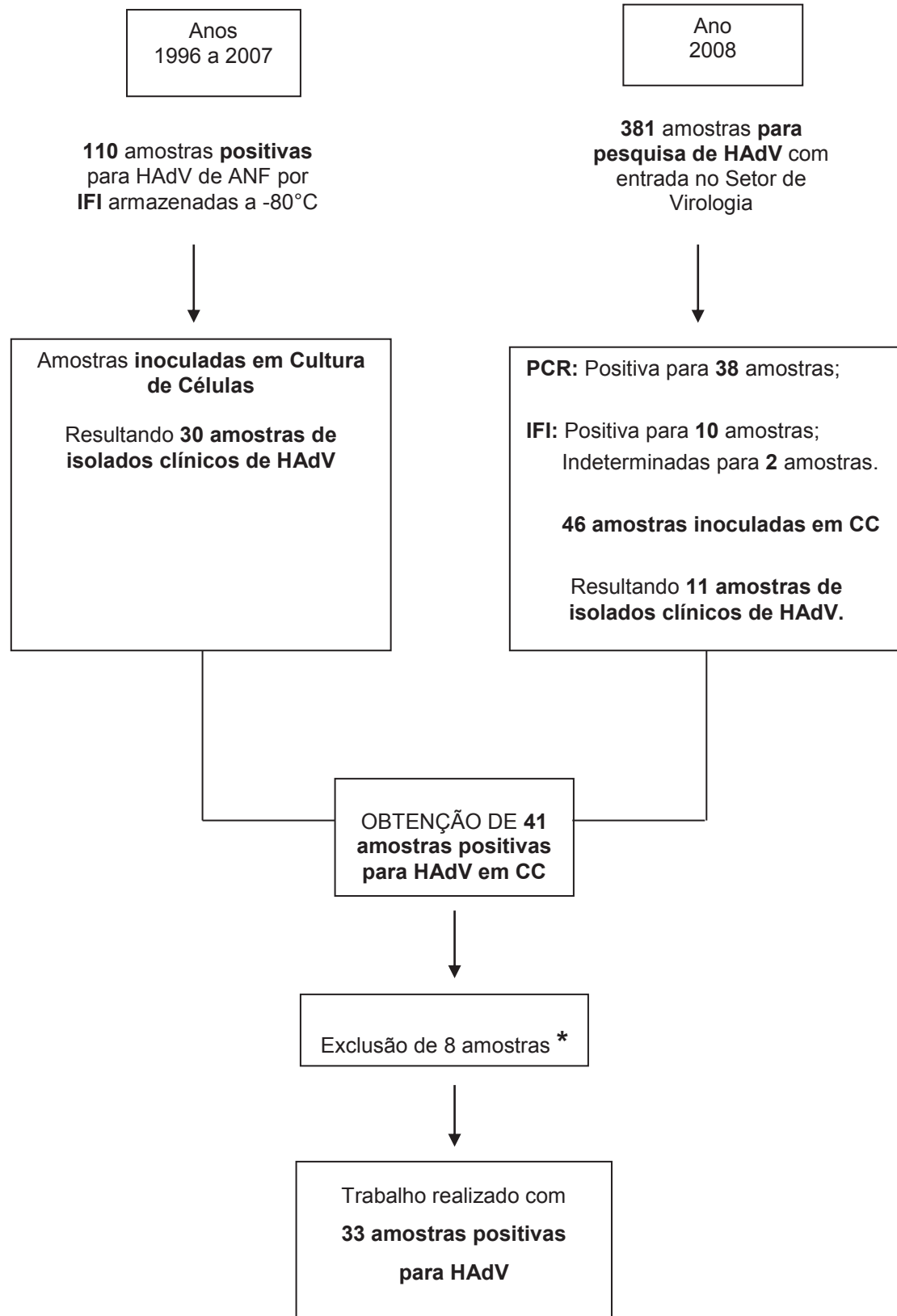


FIGURA 6 – FLUXOGRAMA: MODO DE OBTENÇÃO DAS 33 AMOSTRAS DE HAdV ANALISADAS NESTE ESTUDO

NOTA: HAdV (Adenovírus humano); ANF (Aspirado de Nasofaringe); IFI (Imunofluorescência Indireta); CC (Cultivo Celular)

\* Exclusão: As amostras excluídas foram as da fase retrospectiva, pois, na *nested* PCR, essas oito amostras não amplificaram ou apresentaram um resultado totalmente diferente do esperado, pois há possibilidade de ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.

### 3.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídas amostras de ANF armazenadas pelo Setor de Virologia, com resultado positivo para antígeno de HAdV, coletadas de pacientes com idade inferior a 15 anos, provenientes de unidades pediátricas do HC-UFPR, durante os anos de 1996 a 2008.

### 3.2.2 Critérios de Exclusão

Amostras com isolamento de HAdV prejudicado por contaminação bacteriana ou toxicidade às células do cultivo celular, amostras que não amplificaram ou apresentaram resultado diferente do esperado pela *nested* PCR.

### 3.2.3 Amostras dos anos de 1996 a 2007

Primeira amostragem para este trabalho: ANF triadas por IFI.

Estavam armazenadas 110 amostras de ANF com resultado positivo por IFI para antígeno de HAdV, as quais foram inoculadas em cultura de células HEp-2. Foi obtido o isolamento do HAdV em 30 amostras.

### 3.2.4 Amostras do ano de 2008

Segunda amostragem para este trabalho: ANF de 381 amostras que deram entrada no Setor de Virologia para pesquisa de vírus respiratórios. Essas amostras foram analisadas inicialmente por IFI, cujo resultado foi positivo em 10 e indeterminado em duas amostras.

Todas as 381 amostras foram então triadas pelo método de *nested* PCR. A extração do material genético foi realizada com o método de Tiocianato de Guanidina e precipitação com isopropanol. Das amostras processadas pela PCR, 38 foram positivas para HAdV. Um total de 46 amostras positivas por PCR e (ou) indeterminadas ou positivas para o antígeno de HAdV foram inoculadas em cultura de células HEp-2, sendo o HAdV isolado em 11 casos.

Assim, foi obtido o isolamento do HAdV em 30 amostras (dos anos de 1996 a 2007) e em 11 amostras (do ano de 2008) perfazendo um total de 41 amostras,

das quais oito foram excluídas (dos anos de 1996 a 2007). A exclusão dessas amostras ocorreu devido ao fato da *nested* PCR não amplificar estas amostras ou as mesmas apresentarem um resultado totalmente diferente do esperado, pois há possibilidade de ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.

Restaram 33 amostras nas quais foi possível realizar o sequenciamento e a análise filogenética.

### 3.3 MÉTODO

A coleta das amostras de ANF dos pacientes hospitalizados no HC-UFPR foi realizada no momento da internação para o tratamento da IRA. O processo de coleta de ANF encontra-se no Anexo I.

O setor de virologia do HC-UFPR analisa anualmente aproximadamente 300 amostras coletadas de pacientes hospitalizados nas unidades de pediatria para a pesquisa de vírus respiratórios, pelo método de IFI. O ANF é transportado em meio de transporte viral (Tampão Fosfato Triptose com gelatina 0,5%, pH = 7,2) sob refrigeração. As amostras são imediatamente processadas. Primeiro são centrifugadas a 700 rpm por 10 a 15 minutos a 4°C. O sobrenadante é separado em duas alíquotas: uma para ser usada para isolamento em cultura de células, a qual é tratada com antibiótico (penicilina e estreptomicina 1%) e antifúngico (anfotericina B 1mg/mL) e outra para testes de biologia molecular (PCR). Ambas as alíquotas são armazenadas em freezer a -80°C até o seu processamento. As células do sedimento, obtidas após a centrifugação, são lavadas com tampão fosfato (PBS, pH = 7,2) e depositadas em lâminas de vidro, fixadas em acetona a 4°C por 10 minutos e analisadas por meio do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) para sete vírus: vírus sincicial respiratório (RSV), vírus influenza A (FLUA) e influenza B (FLUB), Adenovírus humano (HAdV), vírus do grupo parainfluenza (PIV1, PIV2 e PIV3) utilizando o *kit CHEMICON International Inc* (Temecula, CA), de acordo com as orientações do fabricante. O anticorpo monoclonal, utilizado para a reação para pesquisa do adenovírus, era contra a proteína hexon do vírus.

### 3.3.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Esta técnica foi executada com as células de cultura que apresentaram ECP, para confirmação do isolamento.

#### 3.3.1.1 IFI realizada diretamente da amostra de ANF

Para técnica de IFI realizada diretamente da amostra de ANF, é necessário processar a amostra clínica e em seguida transferir 20 µL do material em cada spot; deixar secar a amostra sob a lâmina em temperatura ambiente, em seguida, demarcar os spots e armazenar a lâmina em freezer, para proceder à pesquisa do antígeno viral no próximo dia. A técnica descrita encontra-se no item 3.3.1.2

O resultado do ANF por imunofluorescência indireta é liberado em um período de 48 horas após a entrada do material no setor da virologia.

#### 3.3.1.2 IFI realizada da amostra inoculada em células de cultura (HEp-2)

Para o preparo das lâminas para pesquisa do antígeno viral, a monocamada que apresentou ECP teve suas células raspadas com pipeta *pasteur* para soltá-las dos tubos, os quais foram centrifugados a 230g por 10 minutos, o sedimento foi suspenso em meio de cultura, e as células foram fixadas em lâminas de vidro previamente demarcadas contendo 10 orifícios de pequeno diâmetro. Após a secagem do material na lâmina, processou-se a fixação com acetona PA a 4°C por 10 minutos. A lâmina contendo as células já fixadas foi incubada por 30 minutos, a 37°C em câmara úmida com anticorpo monoclonal anti-AdV produzido em camundongo (*Screnn Light Diagnostics*®, Chemicon Inc.)

A lâmina foi lavada por três vezes consecutivas com PBS 0,01 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{xH}_2\text{O}$ ; NaCl), pH = 7,2 e posterior secagem a temperatura ambiente. A lâmina foi incubada por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, desta vez com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), produzido em cabra (*Screnn Light Diagnostics*®, Chemicon Inc.). Em seguida, a lâmina foi rinsada com água destilada. Posteriormente à secagem em temperatura ambiente, a lâmina foi montada com glicerol tamponado e lamínula. A análise da lâmina foi efetuada no microscópio de epi-iluminação com lâmpada de halogênio

para visualização das imagens típicas de células infectadas por HAdV em aumento de 40X, como pode ser visualizado na Figura 7.

Todas as amostras clínicas foram lidas por dois observadores. Amostras com resultados indeterminados, quando impossível definir a presença ou ausência de imagens fluorescentes, eram repetidas com anticorpos monoclonais para HAdV e também para outros vírus que causam ECP em HEp-2, como o RSV e enterovírus (ANDERSON *et al.*, 1985).

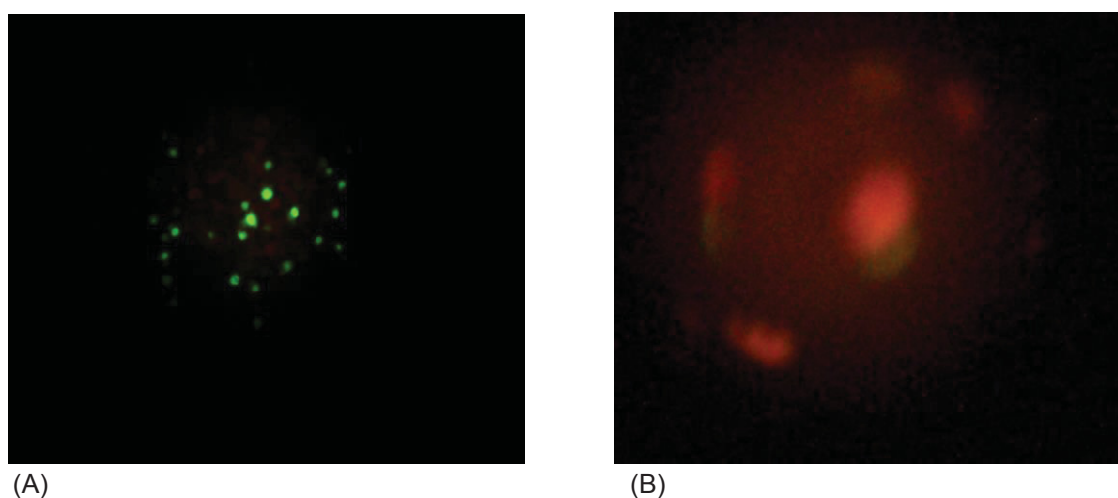


FIGURA 7 - LÂMINAS ANALISADAS EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA  
NOTA: (A) **Reagente** para Adenovírus, caracterizado por pontos verde-maçã (Aumento 40x) e  
(B) **Não Reagente** para Adenovírus (Aumento 100x)  
FONTE: O autor (2011)

### 3.3.2 Isolamento em Cultivo Celular

Resumidamente, as amostras de ANF foram inoculadas em cultura de células HEp-2 e, quando apresentavam efeito citopático, foram analisadas por IFI, e os sobrenadantes de cultura, juntamente com as células raspadas dos tubos de cultivo, foram armazenados a -80°C até a realização da PCR para a identificação de subgêneros e tipos. A PCR somente foi realizada em caso de presença de ECP e/ou IFI reagente.

Evitaram-se sucessivos descongelamentos das amostras clínicas de ANF com vistas a preservar a sensibilidade da técnica de isolamento do HAdV em cultivo celular.

### Descrição da técnica:

Tubos contendo monocamadas de células HEp-2 (célula de carcinoma epidermoide de laringe humana) foram inoculados com 200  $\mu$ L de amostras tratadas com antibióticos e antifúngicos. O inóculo foi adsorvido à monocamada durante incubação por uma hora a 37°C. As células foram mantidas em meio de cultura (Meio Mínimo Essencial Gibco - *Sigma*®), suplementado com 2% de soro bovino fetal, conforme descrito por Mirazo *et al.* (2005). Os tubos foram monitorados para detectar o ECP. A cada segundo dia pós-inoculação, 1 mL do meio que recobria a monocamada era descartado e o mesmo volume de meio fresco era acrescentado, para manutenção das células da monocamada. As células foram examinadas em microscópio invertido binocular durante cinco dias da semana por um período de até um mês, a fim de verificar a presença de ECP. A destruição da monocamada celular, ocorrida durante o cultivo do vírus, dá-se devido à multiplicação viral, e é chamada de efeito citopático (ECP) (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005). Para o HAdV, as células infectadas apresentam-se grandes, arredondadas e, às vezes, reunidas em “cachos”, com alterações nucleares, como ilustrado na Figura 8. Ao observar alterações ocorridas nas células da monocamada, estas foram raspadas e testadas para antígeno HAdV pela técnica de imunofluorescência com um anticorpo monoclonal específico. Foram retirados 500  $\mu$ L do sobrenadante da cultura celular, armazenados a -80°C, para posterior identificação do subgênero de HAdV. Os tubos que não apresentaram ECP foram descartados como negativos após o período de 30 dias.

Células Controle HEp-2

Células HEp-2 + HAdV

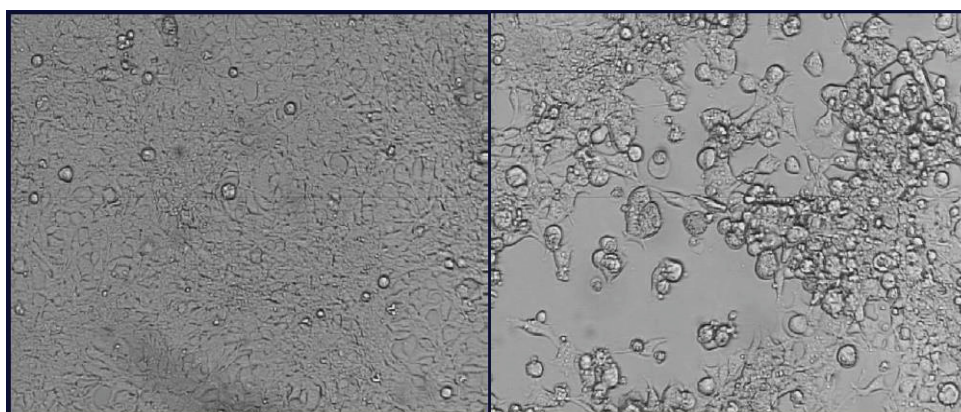


FIGURA 8 - EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO PELO ADENOVÍRUS EM CÉLULAS HEp-2  
FONTE: ROMERO, <http://www.hc.ufmg.br/ccih/simposio/> (acesso em 2009)

O Protocolo de material utilizado para cultura encontra-se no Apêndice V.

### 3.3.3 *Nested* PCR para Detecção do Gene Hexon

#### 3.3.3.1 Extração do DNA viral

O DNA total foi extraído de 200 µL de amostra de ANF utilizando o método do tiocianato de guanidina, conforme descrito por Casas *et al.* (1995) (Apêndice III).

Em um microtubo de 1,5 mL foram acrescentados 200 µL de amostra de ANF que foi aliquotada para a reação de *nested* PCR. Adicionaram-se 200 µL do tampão de lise (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM, pH 7,0, DTT 1 mM, sarkosyl 0,5% e glicogênio 1 µg/µL). Incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, para lise celular. Posteriormente foram adicionados 250 µL de isopropanol frio, conservado a -20°C, para precipitação do material genético. Após centrifugação a 13.000 - 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 500 µL de etanol 70% frio, conservado a -20°C, para lavagem do sedimento. Após nova centrifugação a 13.000 – 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento, contendo o DNA extraído, foi ressuspenso em 22,5 µL de água livre de nucleases. O material genético foi conservado a -80°C até realização da PCR.

#### 3.3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (*Nested* PCR)

O método utilizado foi a *nested* PCR, seguindo o protocolo de Avellón *et al.* (2001), empregando dois conjuntos de iniciadores, sendo o segundo conjunto de iniciadores específico para uma região interna à amplificada pelo primeiro conjunto. Os iniciadores (Quadro 4) foram desenhados tendo como alvo a região codificadora da proteína hexon do genoma do HAdV, de acordo com as sequências disponíveis em bases de dados genômicos (*GenBank*). Os dados demonstram que estes oligonucleotídeos amplificam uma parte altamente conservada dos HAdV. O DNA obtido foi amplificado para detectar uma região do gene hexon do capsídeo (as posições dos nucleotídeos, estão no Quadro 4 e foram baseadas na sequência *Human AdV C complete genome - NCBI Reference Sequence: NC\_001405.1*, com

35.937 pb de DNA linear) para obtenção de banda de 168 pares de base (pb). Para tanto, 2,5 µL do DNA extraído foram amplificados utilizando-se 1 µL de cada um dos iniciadores.

QUADRO 4 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA *NESTED*-PCR

ETAPAS DE PCR	INICIADORES UTILIZADOS	SEQUÊNCIA
Primeira PCR	ADHEX1Foward 20380-20400 nucleotídeos	5'AACACCTAC/TGAG/CTACATGAAC3'
	ADHEX2Reverse 20632-20652 nucleotídeos	5'T/GATGGGGTAA/GAGCATGTT 3'
Segunda PCR	ADHEX2Foward 20485-20503 nucleotídeos	5'CCCA/CTTT/CAACCACCACCG3'
	ADHEX1Reverse 20836-20854 nucleotídeos	5'ACATCCTTG/C/TCG/TGAAGTTCCA 3'

FONTA: AVELLÓN *et al.* (2001)

NOTA: Código de Identificação: Y= C,T; S= G,C; K= G,T; R= A,G; M= A,C; B= G, T, C.

Para a primeira reação, foi utilizada uma solução de reação de 25µL contendo tampão de 10x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (INVITROGEN, *Life Technologies*®, Carlsbad, CA), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (dNTPs) (Boehringer Mannheim, Alemanha), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (ADHEX 1F e ADHEX 2R) e 0,25 µL de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen, *Life Techonologies*®). Estas amostras passaram por 30 ciclos de amplificação realizadas no termociclador. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 60 segundos em 94°C, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 60 segundos a 50°C e extensão por 60 segundos a 72°C. No primeiro ciclo, a etapa de desnaturação foi de dois minutos a 94°C seguida de uma extensão final por 6 minutos a 72°C.

Para a *nested* PCR, 1 µL do produto da primeira amplificação foi adicionado a 24 µL de uma nova mistura de reação similar à primeira amplificação, porém com os oligonucleotídeos iniciadores internos (ADHEX 2F e ADHEX 1R), sendo utilizadas as mesmas condições de ciclagem anterior. Este protocolo do *nested* PCR para o HAdV está apresentado no Apêndice IV.

### 3.3.3.3 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos das amplificações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% (*Sigma Chemical*<sup>®</sup>) em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) (*Gibco BRL*<sup>®</sup>), pH 8,0, corada com brometo de etídio (*Sigma Chemical*) e visualizados sob luz ultravioleta. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram banda no gel e positivas, aquelas que apresentaram uma banda de aproximadamente 168 pb. Foi utilizado na corrida eletroforética, juntamente com as amostras, controles positivo e negativo, um marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker V*, 100 a 12.000 pb, 22 fragmentos, 250 U/ml – 1Kb *Plus DNA Ladder - Amersham Pharmacia Biotech*<sup>®</sup>). A corrida foi desenvolvida a 100 V/cm, por aproximadamente 75 minutos.

### 3.3.3.4 Controles positivo e negativo para a realização do método da PCR

Cada rotina de extração, amplificação por *nested* PCR e detecção das amostras de ANF foi analisada juntamente com um controle positivo para HAdV e um controle negativo (água). Os controles foram processados igualmente às amostras.

### 3.3.4 Identificação de Subgêneros dos HAdV por PCR

Para a realização da PCR para a identificação dos subgêneros de HAdV foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores cujas sequências estão situadas imediatamente acima e abaixo da região VA-RNA gene dos HAdV. *Foward primer* VA3a (5'- CGG T[G/C]A GGC G[T/C]G CGC AGT C -3') e *reverse primer* VA6 (5'- CGC AGC AC[C/G/T/A] GGA TGC ATC T -3'). Estes oligonucleotídeos permitem a detecção de muitos HAdV, mas não os do subgênero F, para o qual foi utilizado o *foward primer* denominado VA3b (5'- CGG TAA GAC GGG CGC AAT C -3') descrito por Kidd *et al.* (1996). Os dados demonstram que esses oligonucleotídeos amplificam uma parte altamente conservada dos HAdV, portanto, detectam todos os diferentes subgêneros descritos.

Para tanto, 0,5 µL do DNA extraído foram amplificados. Foi utilizada uma mistura de reação de 25 µL contendo tampão de 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (INVITROGEN, *Life Technologies*<sup>®</sup>, Carlsbad, CA), 0,2 mM de deoxinucleotídeos

(dNTPs) (Boehringer Mannheim, Alemanha), 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores (VA3a + VA3b) e 1 µL do oligonucleotídeo iniciador (VA6) e 0,25 µL de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen, *Life Technologies*®). As misturas passaram por 35 ciclos de amplificação realizadas em um termociclador. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 60 segundos em 94°C, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 60 segundos a 45°C e extensão por três minutos a 72°C. No primeiro ciclo, a etapa de desnaturação foi de 60 segundos a 94°C seguida de uma extensão final por 8 minutos a 72°C. Técnica baseada na publicação de Kidd *et al.*, 1996.

O protocolo para a identificação de subgêneros dos HAdV está apresentado no Apêndice VI.

#### 3.3.4.1 Detecção do produto amplificado

Os produtos das amplificações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% (*Sigma Chemical*®) em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) pH = 8,0 (*Gibco BRL*®), corado com brometo de etídio (*Sigma Chemical*®) e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram banda no gel, e positivas aquelas que apresentaram produto esperado: 240 a 290 pb (Subgênero A, B:2 e F) e 400 a 520 pb (Subgênero B:1, C, D e E), de acordo com Kidd *et al.* (1996). Foi utilizado na corrida eletroforética, juntamente com as amostras, controle positivo e negativo da reação e um marcador de peso molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder Marker V*, 100 a 12.000 pb, 22 fragmentos, 250 U/ml, *Amersham Pharmacia Biotech*®). A corrida eletroforética se desenvolveu a 100 V, por aproximadamente 75 minutos.

#### 3.3.4.2 Determinação dos subgêneros por restrição enzimática

Para a determinação dos subgêneros de HAdV a partir dos produtos da PCR para o gene VA-RNA, foi realizado digestão com enzimas de restrição, e o resultado foi comparado com os padrões de digestão descritos por Kidd *et al.* (1996).

Foi utilizado 0,5 µL de cada uma das seguintes endonucleases de restrição: *Ava I*, *BstB I* e *Taqα I* (*Boehringer Mannheim Biochemicals*®, Quebec, Canadá) e 5 µL do produto amplificado. O produto da PCR com 240 a 290 pb foi incubado com 0,5 µL de *Ava I* por 1 hora a 37°C e após acrescentado 0,5 µL de *BstB I* e incubado

por 1 hora a 65°C. O produto de PCR que evidenciou bandas com 400 a 520 pb foi incubado com 0,5 µL de *Taq*I por 1 hora e 30 minutos a 65°C, como mostra a Figura 9. Após, as amostras devidamente digeridas foram adicionadas ao gel de agarose a 1,0%. A corrida se desenvolveu a 100V por 1 hora em tampão Tris-fosfato (pH = 7,5). As bandas de DNA foram coradas com brometo de etídio e o gel foi visualizado em luz UV. A classificação dos HA $\nu$ V foi feita pela análise dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição (Quadro 5), característicos para cada subgênero, com a utilização do *software E-capt version 12.7 for Windows 2004-2005*.

#### DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO PRODUTO DE PCR – GENE VA-RNA

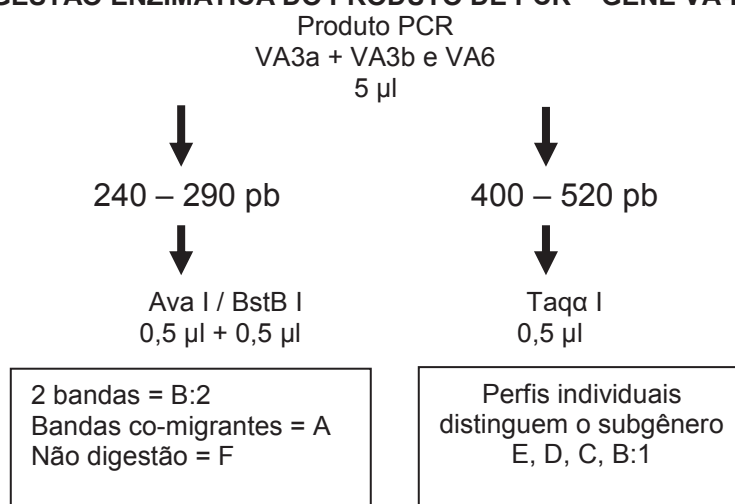


FIGURA 9 - DETERMINAÇÃO DOS SUBGÊNEROS DE HA $\nu$ V UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

FONTE: Adaptado de KIDD *et al.* (1996)

QUADRO 5 – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E SÍTIOS DE CORTE

ENZIMA	SEQUENCIA	SÍTIO DE CORTE	OVERHANG
Ava I	CYCGRG	C/Y C G R G G R G C Y/C	5' - YCGR
BstB I	TTCGAA	T T/C G A A A A G C/T T	5' - CG
Taq I	TCGA	T/C G A A G C/T	5' - CG

FONTE: New England *BioLabs* – (acesso em 2009)

O trabalho de Kidd *et al.* (1996) utilizado como parâmetro para a identificação dos subgêneros de HAdV, com enzimas de restrição, especifica o marcador de peso molecular utilizado (Marcador VIII – *Boehringer*®), porém não indica nos géis a linha com o marcador com seus devidos pesos moleculares, como mostram as Figuras 10, 11 e 12, retiradas do trabalho desses autores.

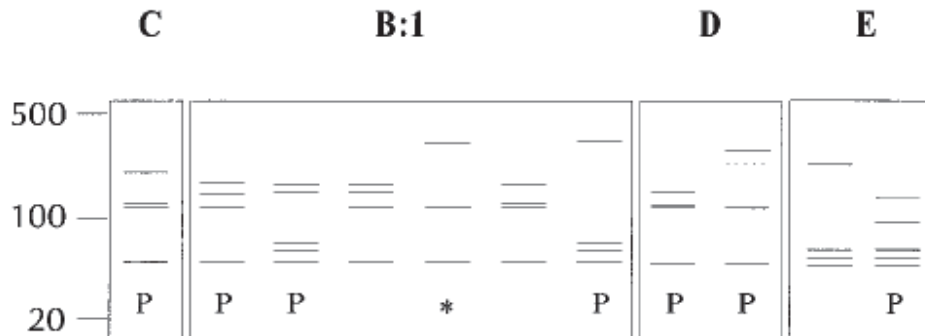


FIGURA 10 - DIAGRAMA REPRESENTANDO TODOS OS PRODUTOS DO GENE VA-RNA DIGERIDOS COM A *Taq I*

NOTA: (P) – Desenho esquemático dos subgêneros C, B:1, D e E. Produtos da PCR do gene VA-RNA digeridos com a endonuclease *Taq I* e (\*) - representação do genoma do HAdV sorotipo 7 fragmentado pela *Taq I*

FONTE: KIDD *et al.* (1996)

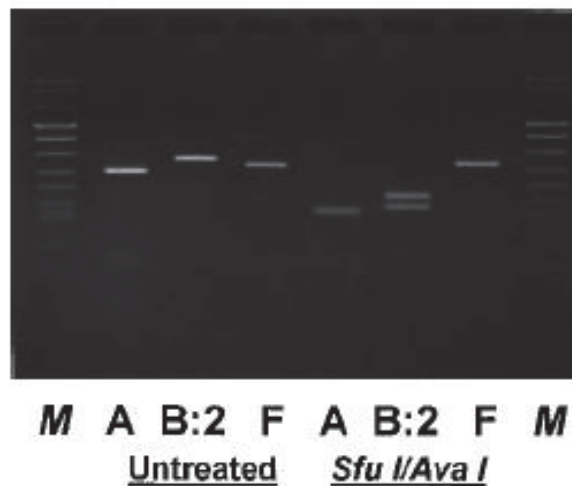


FIGURA 11 - PRODUTOS DA DIGESTÃO DO GENE VA-RNA DO HAdV INDICANDO O SUBGÊNEROS A, B:2 e F

NOTA: Coluna M: Marcador de peso molecular (1, 114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67 e 37 pb)

FONTE : KIDD *et al.* (1996)

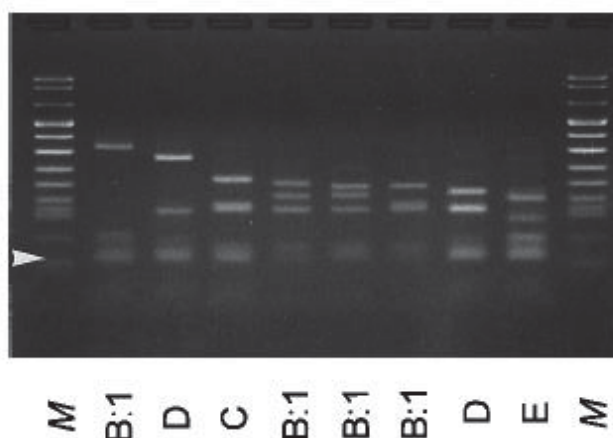


FIGURA 12 - PRODUTOS DA DIGESTÃO DO GENE VA-RNA DO HAAdV INDICANDO O SUBGÊNEROS B:1, C, D e E

NOTA: Coluna M: Marcador de peso molecular (1, 114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67 e 37 pb)

FONTE: KIDD *et al.* (1996)

#### 3.3.4.3 Determinação dos subgêneros por sequenciamento genético

Para a determinação dos subgêneros de HAAdV por sequenciamento genético, o produto obtido pela PCR foi purificado utilizando o kit *Pure Link™ Quick gel Extraction kit* (INVITROGEN, *Life Technologies*®, Carlsbad, CA), de acordo com as informações do fabricante (Anexo II), e quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* e uma concentração final de 5 a 10 ng de DNA foi utilizada para o sequenciamento genético do gene VA-RNA. Ambas as fitas foram sequenciadas com os iniciadores (VA3a e VA6) utilizados na reação de PCR para subgênero. O material purificado foi enviado para a Macrogen, empresa Coreana de Biotecnologia, a qual presta serviço de assistência para sequenciamento de DNA.

#### 3.3.4.4 Obtenção de seqüências e análises filogenéticas

As amostras obtidas da PCR foram submetidas a reações de sequenciamento parcial para o gene VA-RNA utilizando *BigDye Terminator (Applied Biosystems*®, Foster City, California) para ambas as fitas do DNA (3' e 5'), empregando os mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR. Os produtos destas reações foram purificados e submetidos à leitura em um sequenciador ABI3730XL. As leituras das fitas 3' e 5' de cada amostra foram utilizadas para obter

sequência de consenso entre as fitas utilizando o software de análise desenvolvido por Staden (1996). Para doze amostras não foi possível obter leituras de ambas as fitas, sendo que nesses casos apenas uma fita foi utilizada para as demais análises.

As sequências obtidas foram depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adicionalmente, foram obtidas no *GenBank* outras 14 sequências representando diversos sorotipos de HAdV e duas de SAdV já previamente estabelecidos. O Quadro 6 indica todas as sequências utilizadas e seus respectivos números de acesso no *GenBank*.

QUADRO 6 - SEQUÊNCIAS REFERÊNCIA UTILIZADAS E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO *GENBANK*

Amostra	Número de acesso no <i>GenBank</i>
HAdV sorotipo 2	J01917
HAdV sorotipo 3	DQ086466
HAdV sorotipo 4	AY594253
HAdV sorotipo 5	M73260
HAdV sorotipo 7	AY601634
HAdV sorotipo 9	AJ854486
HAdV sorotipo 11	AY163756
HAdV sorotipo 12	X73487
HAdV sorotipo 17	AF108105
HAdV sorotipo 21	AY601633
HAdV sorotipo 35	AC000019
HAdV sorotipo 40	L19443
SAdV sorotipo 21	AR101858
SAdV sorotipo 25	AR101859

FONTE: O autor (2011)

As sequências foram alinhadas utilizando o programa Mafft (KATOHI *et al.*, 2002). O alinhamento obtido foi inspecionado e manualmente editado no programa BioEdit (HALL, 1999) para todas as sequências. O alinhamento foi analisado no programa jModelTest utilizando o Critério de Informação Bayesiano, uma vez que foi demonstrado que esse tem um desempenho melhor que outros comumente usados (LUO *et al.*, 2010). As análises consideraram três esquemas de substituição de DNA. Estatísticas descritivas do alinhamento e valores de similaridade genética foram calculadas usando o programa MEGA 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011).

#### 3.3.4.5 Alinhamento e escolha de modelo de evolução de DNA

Foram realizadas análises filogenéticas por diferentes métodos, porém, para fins comparativos, todas as análises foram realizadas em um computador Intel Core

2 Quad Q6600 (2.4 GHz) com 4 Gb de memória RAM, utilizando o *Windows XP SP2*<sup>®</sup>.

As análises por máxima verossimilhança foram realizadas no programa *GARLI* 1.0 Multithread (disponível em <http://garli.googlecode.com>). Foi realizada uma busca pela melhor árvore com dez réplicas, com os parâmetros do modelo sendo estimados pelo programa a cada 100 gerações, para melhorar a estimativa da árvore. A árvore com melhor topologia (padrão de ramificação) foi escolhida pelo maior valor de verossimilhança. O suporte dos ramos foi estimado com o mesmo programa, utilizando 1.000 réplicas não paramétricas de *bootstrap*. Os resultados dessas análises foram sumarizados em uma árvore de consenso utilizando o software *Python SumTrees* (plota os valores de suporte na árvore de consenso) (SUKUMARAN, HOLDER, 2010).

Foram realizadas análises por inferência Bayesiana no programa *Beast* 1.6.1 (DRUMMOND, RAMBAUT, 2007), sendo realizadas três réplicas com duração de 2.000.000 gerações, amostradas a cada 1.000 gerações. As réplicas foram avaliadas quanto a convergência das cadeias de Markov-Monte Carlo, utilizando o programa *Tracer* 1.5 (RAMBAUT, DRUMMOND, 2009), o qual também foi utilizado para calcular os valores dos Fatores de Bayes (*Bayes Factors*) entre as cadeias utilizando 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os Fatores de Bayes foram calculados como a estimativa da verossimilhança marginal segundo o método de Newton e Raftery (1994), com as modificações propostas por Suchard *et al.* (2001). Para interpretação dos resultados foram utilizados como guia os valores propostos por Kass e Raftery (1995) para interpretação dos valores de  $\log_{10}(B_{10})$ .

Foram descartados, após alinhamento das sequências, cerca de 10% dos nucleotídeos iniciais e terminais das amostras de cada cadeia de Markov-Monte Carlo de cada replicata, equivalentes ao período em que a cadeia ainda não está estabilizada (*burn-in*). Como as réplicas foram equivalentes, as árvores de ambas as réplicas foram combinadas e analisadas no programa *TreeAnnotator* 1.6.1 (DRUMMOND, RAMBAUT, 2007) para obtenção de uma árvore de consenso.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA – Colocar os testes nas análises

Os dados obtidos foram armazenados em planilha eletrônica (*Microsoft Excel*<sup>®</sup>) e transportados para o *software* JMP 5.1 para as análises estatísticas.

As medidas de tendência central e dispersão das variáveis contínuas foram expressadas em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana. As variáveis nominais foram expressadas em porcentagem do total.

Testes não paramétricos (Mann-Whitney, Wilcoxon e Kruskal-Wallis) foram usados para comparação de variáveis contínuas; teste de qui-quadrado e Teste Exato de Fisher para comparar duas ou mais variáveis nominais.

As variáveis necessidade de internação em UTI, tempo total de internamento e evolução para óbito foram consideradas como fatores de gravidade para infecção respiratória por HAdV.

O nível de significância mínimo adotado foi de 5%.

A concordância *kappa* foi calculada utilizando-se o *software* JMP 5.1, por meio dela foi avaliada a concordância diagnóstica entre os métodos IFI e *nested* PCR e também para o sequenciamento e enzima de restrição (*kappa* = 0 define não concordância e *kappa* = 1 define concordância total). Cálculo da sensibilidade e especificidade para IFI e PCR.

### 3.5 ÉTICA EM PESQUISA

A utilização de amostras humanas de secreção respiratória foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HC-UFPR, sob número de registro 2007021789 (Anexo III). Segundo informações prévias do CEP, no caso de pesquisa em prontuários e em amostras já estocadas, ficou dispensado o termo de consentimento informado dos pacientes estudados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *NESTED* PCR PARA DETECÇÃO DO HAdV

No laboratório de biologia molecular do HC-UFPR foi padronizada a técnica de *nested* PCR, método utilizado para detecção do HAdV, seguindo o protocolo de Avellón *et al.* (2001). A Figura 13 apresenta o gel de agarose com as bandas obtidas após aplicação dos materiais amplificados, cujo tamanho do produto é de aproximadamente 168 pb, para o gene hexon do HAdV.

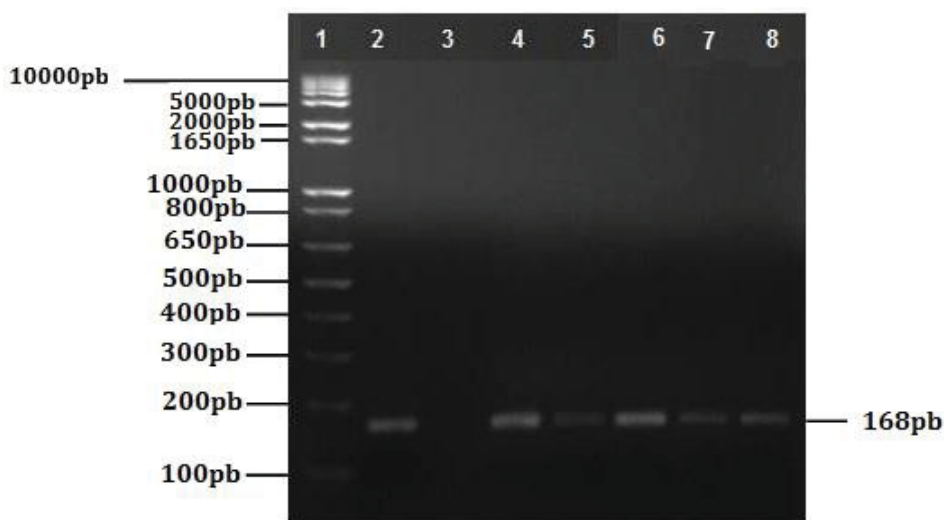


FIGURA 13-ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA *NESTED* PCR PARA DETECÇÃO DO GENE HEXON (168 pb) do HAdV

NOTA: Coluna 1: Marcador de *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies); Coluna 2: Controle positivo; Coluna 3: Controle negativo; Colunas de 4 a 8: amostras de sobrenadante de cultura de ANF positivas

FONTE: O Autor (2011)

### 4.2 COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DAS TÉCNICAS DE PESQUISA DE ANTÍGENO VIRAL E DETECÇÃO MOLECULAR PARA O HAdV

Após a padronização do *nested* PCR, realizou-se a pesquisa do DNA viral em todas as amostras de ANF que foram encaminhadas ao laboratório de virologia no ano de 2008 (n= 381). O resultado obtido foi comparado com os achados de IFI. Neste estudo, a técnica de *nested* PCR, padronizada para detecção do gene hexon do HAdV, foi positiva em 38/381 (10%) das amostras. A IFI foi positiva em dez e indeterminada em duas amostras. Destas 46 amostras positivas para PCR e (ou) IFI,

obteve-se o isolamento viral em 11 casos. A análise das características operacionais da *nested* PCR foi realizada comparando-se os resultados do ano de 2008 com os do método da IFI, esta era a metodologia realizada de rotina no serviço. Os dados de cultivo celular não puderam ser utilizados, porque esta técnica não foi realizada com todas as amostras. Não foram incluídos, no cálculo, os resultados de quatro amostras para as quais o resultado de IFI foi: indeterminado para duas amostras e não realizado em outras duas. Foram calculadas, para as 377 amostras, a sensibilidade, especificidade e proporção de concordância observada na comparação entre as técnicas (Tabela 1).

TABELA 1 – ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA PCR E IFI

PCR	Teste Referência: IFI	
	Positivo	Negativo
Positivo	A = 4	B = 34
Negativo	C = 6	D = 333
Total	10	367

NOTA: Não foram incluídos no cálculo os resultados de quatro amostras para as quais o resultado de IFI foi: indeterminado para duas amostras e não realizado em outras duas – (n= 377).

Considerando IFI como padrão ouro foram verificadas uma sensibilidade de 40% e especificidade de 90% para a PCR, as razões de verossimilhança positiva e negativa foram 4,4 e 0,6, respectivamente. Obteve-se um coeficiente *kappa* de 0,13. Obteve-se seis amostras reagentes para IFI e as mesmas negativas pela PCR, isso pode ter ocorrido pelo fato do acondicionamento e processamento das amostras em momentos diferentes, ou seja, não recuperação do material genético.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA VIRAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS HAdV ISOLADOS

#### 4.3.1 Determinação dos Subgêneros dos HAdV

Após padronização da técnica de *nested* PCR para detecção de HAdV, as amostras positivas de ANF foram submetidas à identificação do subgênero dos HAdV, por outro protocolo de PCR, utilizando os iniciadores VA3a, VA6 e VA3b para amplificação do gene VA-RNA. O resultado foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os produtos obtidos constam na Figura 14, sendo que os resultados esperados foram: aproximadamente 300 pb para os Subgêneros A, B:2 e F e superior a 400 pb para os Subgêneros B:1, C, D e E, o resultado dessa digestão foi comparado com os padrões de digestão descritos por Kidd *et al.* (1996), com a utilização do *software E-capt version 12.7 for Windows 2004-2005*.

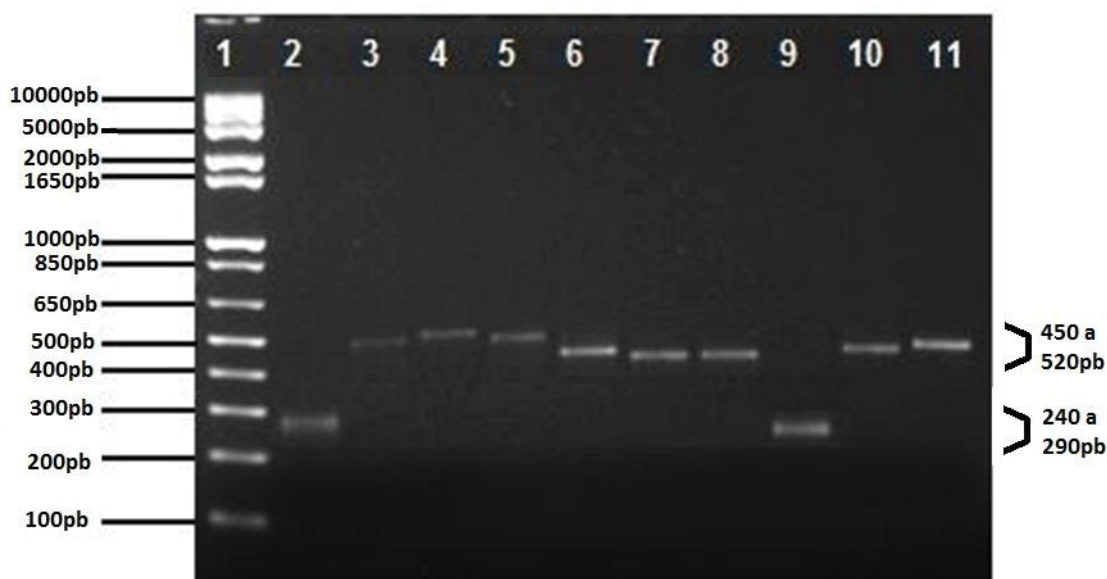


FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DOS AMPLIFICADOS PELA PCR SUBGÊNEROS PARA DETECÇÃO DO GENE VA-RNA DO HAdV

NOTA: Coluna 1: Marcador de *1Kb Plus DNA Ladder*; Colunas 2 e 9: Amostras apresentando sinais do produto amplificado de aproximadamente de 240 a 290 pb, Colunas: 3 a 8, 10 e 11: Amostras apresentando aproximadamente de 450 a 520 pb.

FONTE: O Autor (2011)

#### 4.3.1.1 Subtipagem por enzima de restrição

Após estabelecer a diversidade entre as amostras para a diferenciação dos subgêneros, foi realizada digestão dos produtos amplificados com enzima de restrição a fim de obter com precisão o subgênero a que pertencia o HAdV estudado em cada uma das amostras analisadas.

Utilizando esse método de identificação dos subgêneros, foram detectados os genótipos B:1, B:2 e C. O subgênero D foi verificado por meio do sequenciamento e não por enzima de restrição. O resultado foi analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. A digestão somente pode ser evidenciada nas amostras que mostraram maior intensidade da banda de amplificação do gene VA-RNA.

A Figura 15 apresenta o gel contendo amostra não digerida e em sequência a mesma digerida para os subgêneros B:2, C e B:1.

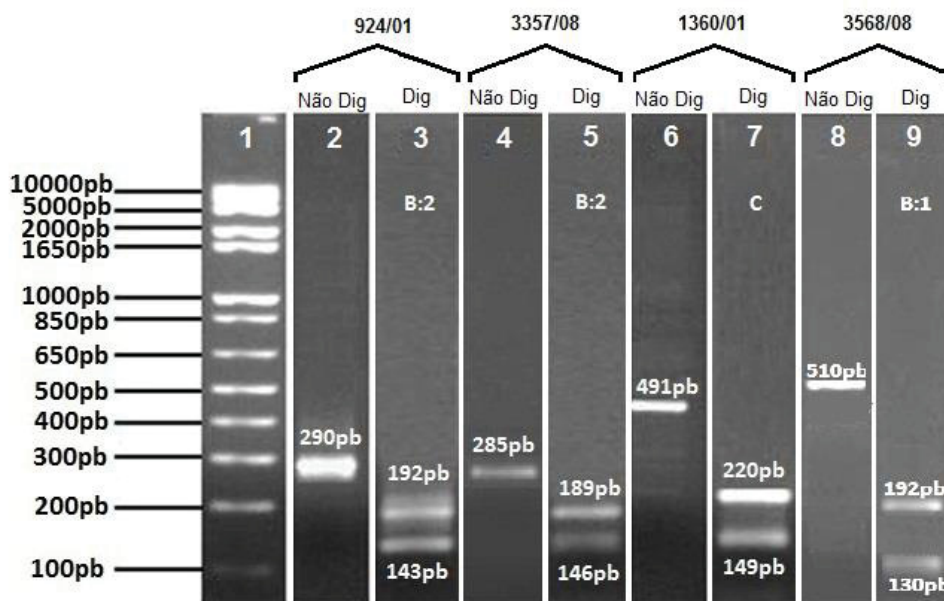


FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO) DO SEGMENTO DO GENE VA-RNA AMPLIFICADO POR PCR DIGERIDO OU NÃO PARA DETERMINAÇÃO DOS SUBGÊNEROS

NOTA: Coluna 1: Marcador de *1Kb Plus DNA Ladder*; Coluna 2: Amostra n.º 924/01 apresentando 290 pb não digerida, Coluna 3: Amostra n.º 924/01 digerida identificada como subgênero B:2 (143 e 192 pb), Coluna 4: Amostra n.º 3357/08 não digerida apresentando 285 pb, Coluna 5: Amostra n.º 3357/08 digerida identificada como subgênero B:2 (146 e 189 pb), Coluna 6: Amostra n.º 1360/01 não digerida apresentando 491 pb, Coluna 7: Amostra n.º 1360/01 digerida identificada como subgênero C (149 e 220 pb), Coluna 8: Amostra n.º 3568/08 não digerida apresentando 510 pb, Coluna 9: Amostra n.º 3568/08 digerida identificada como subgênero B:1 (130 e 192 pb)

FONTE: O autor (2011)

Houve dificuldade em diferenciar, por enzima de restrição, os subgêneros B:1 e B:2, uma vez que as bandas que os representam aparecem com pouca diferença de tamanho em pb. Em duas das amostras houve dúvida quanto a ser subgênero B:1 ou B:2. Fato percebido na Figura 15: o subgênero B:1 apresenta uma banda que migra mais, ficando em torno de 130 pb. Para o subgênero B:2, a banda que migra mais aparece em torno de 143 pb. Também não foi possível classificar o subgênero D utilizando a técnica de enzima de restrição, uma vez que tais enzimas podem não ter reconhecido as sequências específicas de nucleotídeos para cortá-las nesta amostra estudada.

#### 4.3.1.2 Subtipagem por sequenciamento genético

O material purificado foi enviado para a Empresa *Macrogen*<sup>®</sup>.

Obteve-se o sequenciamento para todas as amostras positivas em Cultivo Celular, das quais, 19 representam sequências de consenso entre ambas as fitas do DNA, enquanto outras 12 representam apenas uma das fitas em condições para análise. As árvores filogenéticas foram construídas com 31 amostras sequenciadas, pois os programas utilizados não conseguiram alinhar duas amostras do ano de 2001. Adicionalmente foram obtidas no *GenBank* 14 sequências do gene VA-RNA representando diversos grupos de HAdV distintos.

Em relação aos anos de 1996 a 2008, foram obtidas 33 amostras positivas, dentre as quais: uma (3%) amostra do ano de 1996, uma (3%) amostra do ano de 1998, duas (6%) amostras do ano de 2000, cinco (15%) amostras do ano de 2001, seis (18%) amostras do ano de 2002, duas (6%) amostras do ano de 2003, três (9,1%) amostras do ano de 2004, uma (3%) amostra do ano de 2005, uma (3%) do ano de 2006 e 11 (33,3%) amostras do ano de 2008 (Figuras 16 e 17).

Na Figura 16, observamos que o isolamento por ano variou de 8% a 65%, em relação ao número de amostras positivas por IFI.

Os resultados obtidos sugerem uma mudança na prevalência dos tipos. De 1996 a 2002 foram encontradas apenas amostras relacionadas ao tipo 7, com somente uma ocorrência ocasional desse tipo após tal data (amostra BR/PR 973/05). A partir de 2003 todas as amostras obtidas do subgênero B:1 foram relacionadas ao tipo 3.

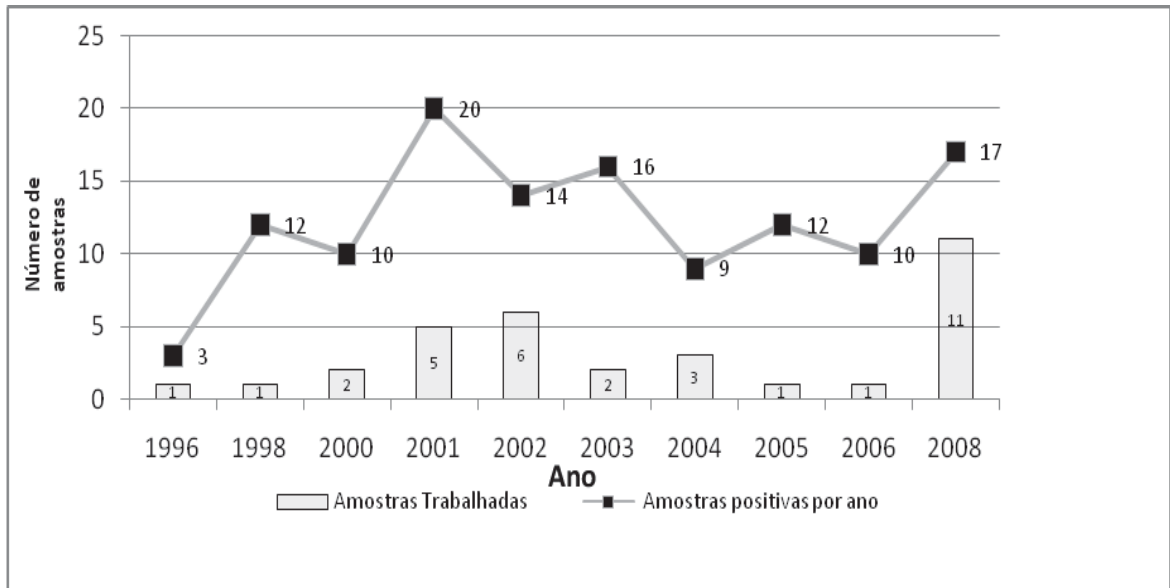


FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS (DE 1996 A 2008) PARA HAAdV DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, POR IFI, CONGELADAS NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA  
 FONTE: O autor (2011)

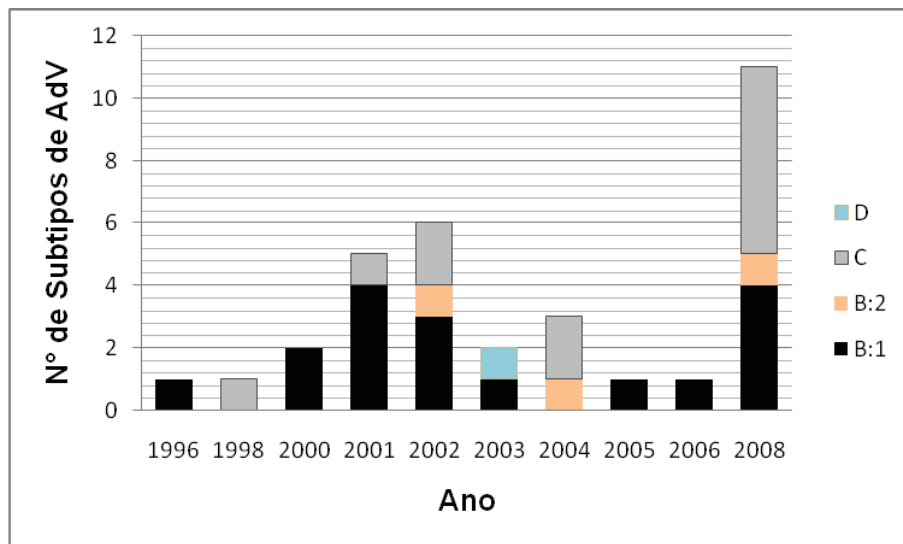


FIGURA 17 - SUBGÊNEROS DE HAAdV ENCONTRADOS POR SEQUÊNCIAMENTO GENÉTICO EM AMOSTRAS DE ANF DE 33 CRIANÇAS HOSPITALIZADAS ENTRE 1996 a 2008  
 FONTE: O autor (2011)

Após realizada a caracterização do HAdV por enzima de restrição e sequenciamento, foi calculada a proporção de concordância entre as duas técnicas para os subgêneros detectados, de acordo com os resultados da Tabela 2.

Em relação ao sequenciamento *versus* enzima de restrição foi alcançado uma boa concordância nos resultados de (24/33) 72,7% - Índice *kappa* 0,72.

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE DETERMINAÇÃO DE SUBGÊNEROS OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Subgêneros	Técnicas	
	Enzima de Restrição	Sequenciamento
B:1	14	17
B:2	1	3
C	9	12
D	0	1
Total	24	33

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Índice *kappa* 0,72

As 33 amostras trabalhadas foram sequenciadas, porém, por enzima de restrição foi obtido resultado para 24 destas amostras, devido aos seguintes fatos: não foi possível classificar o subgênero D pois não houve corte nesta amostra estudada. Em um caso não foi possível obter resultado de bandas digeridas para o subgênero B:1, em três casos para C e em dois casos para B:2. Em sete amostras houve dificuldade na obtenção de bandas após a digestão, tal fato foi verificado no sequenciamento o qual apontou troca de base no ponto de corte por enzima de restrição. Em duas amostras houve resultados discordantes: na primeira, por enzima de restrição foi classificada como subgênero B:2 e pela análise de sequenciamento o resultado foi B:1; na segunda amostra o resultado foi inverso: por enzima de restrição foi classificada como subgênero B:1 e pela análise de sequenciamento o resultado foi B:2. Em relação ao sequenciamento *versus* enzima de restrição foi alcançado uma concordância nos resultados de (24/33) 72,7%.

A detecção dos subgêneros B:1 respondeu por 82% de concordância entre as duas técnicas; para o subgênero B:2, 33% de concordância; para o subgênero C, 75% de concordância.

Para as 33 amostras analisadas por sequenciamento, obteve-se a seguinte classificação: 51,5% (17/33) subgênero B:1, (3/33) 9,1% subgênero B:2, (12/33) 36,4% subgênero C e (1/33) 3% subgênero D.

#### 4.3.1.3 Análise filogenética

A análise da árvore filogenética foi organizada com as sequências nucleotídicas obtidas para o gene VA-RNA. Os subtipos dos HAdV detectados foram diferenciados por meio do estudo da similaridade das sequências obtidas com as sequências referências acessadas no *GenBank* para cada sorotipo.

O alinhamento final das sequências apresentou 618 posições, sendo 190 sítios conservados e 403 variáveis, dos quais 311 foram considerados informativos para as análises. O tamanho das sequências obtidas depois de alinhadas variou entre 287 e 531 pares de bases. No alinhamento é possível identificar os diversos grupos de HAdV devido a características particulares das sequências, por exemplo, a posição de inserções e (ou) deleções (Tabela 12 – Apêndice VII).

Os valores de similaridade genética entre as amostras obtidas por este estudo identificadas como de um mesmo grupo (análise filogenética) não apresentou uma grande variação, com altos valores de concordância (Tabela 3). As Tabelas 4 a 8 apresentam similaridades genéticas específicas para cada linhagem, incluindo as amostras do *GenBank*.

TABELA 3 - VALORES DE SIMILARIDADE GENÉTICA DENTRO DE CADA GRUPO DE HAdV AMOSTRADO

Subgênero	<i>n</i>	Similaridade Genética
B:1 sorotipo 3	6	94,8 ± 1,6
B:1 sorotipo 7	9	96,5 ± 1,2
B:2	3	99,3 ± 0,7
C	12	99,5 ± 0,3
D	1	---

NOTA: Os valores apresentados são a média e erro padrão  
 FONTE: O autor (2011)

TABELA 4 - SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:1, SOROTIPO 3 PARA O GENE VA-RNA

Amostra	1	2	3	4	5	6
1 HAdV sorotipo 3 (DQ086466)	-----					
2 BR/PR 1370/03	96,69	-----				
3 BR/PR 2666/06 VA6	95,95	98,39	-----			
4 BR/PR 1726/08	97,18	99,55	98,86	-----		
5 BR/PR 3316/08	97,18	99,55	98,86	100,00	-----	
6 BR/PR 3361/08	96,93	99,32	98,62	99,77	99,77	-----
7 BR/PR 3568/08	97,18	99,55	98,86	100,00	100,00	99,77

FONTE: O autor (2011)

TABELA 5 - SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:1, SOROTIPO 7 PARA O GENE VA-RNA

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 HAdV sorotipo 7 (AY601634)	-----								
2 BR/PR 728/96	99,38	-----							
3 BR/PR 1888/00 VA3a	99,69	99,69	-----						
4 BR/PR 2126/00 VA3a	99,69	99,69	100,00	-----					
5 BR/PR 227/01	99,38	100,00	99,69	99,69	-----				
6 BR/PR 2228/01 VA3a	93,99	93,99	94,35	94,35	93,99	-----			
7 BR/PR 1986/02 VA3a	95,06	95,06	95,41	95,41	95,06	89,42	-----		
8 BR/PR 1433/02 VA3a	99,38	100,00	99,69	99,69	100,00	93,99	95,06	-----	
9 BR/PR 1448/02	99,38	100,00	99,69	99,69	100,00	93,99	95,06	100,00	-----
10 BR/PR 973/05_VA3a	99,38	99,38	99,69	99,69	99,38	93,99	95,76	99,38	99,38

FONTE: O autor (2011)

TABELA 6 - SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO B:2, PARA O GENE VA-RNA

Amostra	1	2	3	4
1 HAdV sorotipo 11 (AY163756)	-----			
2 HAdV sorotipo 35 (AC000019)	99,11	-----		
3 BR/PR 1477/02	95,81	95,80	-----	
4 BR/PR 289/04 VA3a	95,32	94,31	93,79	-----
5 BR/PR 3357/08 VA3a	98,19	97,26	95,81	95,32

FONTE: O autor (2011)

TABELA 7 - SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO C, PARA O GENE VA-RNA

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 HAdV sorotipo 2 (J01917)	-----												
2 HAdV sorotipo 5 (M73260)	98,13	-----											
3 BR/PR 840/98	99,26	98,90	-----										
4 BR/PR 1360/01 VA3a	97,76	95,77	96,97	-----									
5 BR/PR 1971/02	99,64	98,52	99,64	97,37	-----								
6 BR/PR 1335/02 VA3a	99,64	98,52	99,64	97,37	100,00	-----							
7 BR/PR 33/04	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	-----						
8 BR/PR 291/04	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	99,26	-----					
9 BR/PR 777/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	100,00	99,26	-----				
10 BR/PR 2357/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	100,00	99,26	100,00	-----			
11 BR/PR 3204/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	99,26	99,26	99,26	99,26	-----		
12 BR/PR 3205/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	99,26	99,26	99,26	99,26	100,00	-----	
13 BR/PR 3219/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	99,26	99,26	99,26	99,26	100,00	100,00	-----
14 BR/PR 3252/08	99,26	98,13	99,26	96,97	99,64	99,64	99,26	99,26	99,26	99,26	100,00	100,00	100,00

FONTE: O autor (2011)

TABELA 8 - SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AMOSTRAS DO GRUPO D PARA O GENE VA-RNA

Amostra	1	2
1 HAdV sorotipo 9 (AJ854486)	-----	
2 HAdV sorotipo 17 (AF108105)	97,80	-----
3 BR/PR 574/03 VA3a	92,48	92,77

FONTE: O autor (2011)

As análises filogenéticas por ambos os métodos (verossimilhança e inferência bayesiana) apresentaram resultados similares (Figuras 18 e 19), recuperando as mesmas amostras dentro dos diferentes grupos, apesar de apresentarem diferenças topológicas dentro dos grupos em si, devido ao pequeno tamanho dos ramos.

Utilizando a metodologia de Máxima Verossimilhança, a busca pela melhor árvore foi realizada em 48 min e 14 seg, enquanto o cálculo do suporte via *bootstrap* levou 56 horas, 12 min e 24 seg. A busca da análise por Máxima Verossimilhança resultou em dez árvores com o mesmo valor de verossimilhança, porém com topologias levemente diferentes dentro dos grupos e pequenas diferenças no tamanho dos ramos. A árvore mostrada na Figura 19 foi a escolhida como melhor pelo programa *GARLI*. Os valores de *bootstrap* encontrados variaram bastante entre os ramos, com os que representam os diversos grupos de HAdV apresentando um bom suporte (maior ou igual a 0,75). Porém, dentro dos grupos propriamente ditos, o suporte foi altamente variável, com a topologia interna de alguns grupos apresentando um suporte muito baixo. O Quadro 7 apresenta as sequências utilizadas e seus respectivos números de acesso no *GenBank*.

A classificação original foi realizada com base em critérios sorológicos, assim, talvez o uso de genes estruturais / imunogênicos para a análise filogenética apresentem uma correlação melhor com a classificação original e com a sorotipagem; isso talvez explique a aparente contradição de resultados filogenéticos ao utilizar o gene hexon em comparação ao gene VA-RNA. O gene utilizado e o tamanho da sequência podem trazer resultados diferentes ao realizar uma árvore filogenética. Pode-se observar que o subgênero D ficou pareado entre os subgêneros B:2 e B:1 tipo 7, isso talvez pode ser um rearranjo ocorrido na amostra pesquisada que foi identificada como subgênero D. Outro fator pode ser devido o próprio gene utilizado para a realização da árvore, visto que o mesmo é hipervariável.

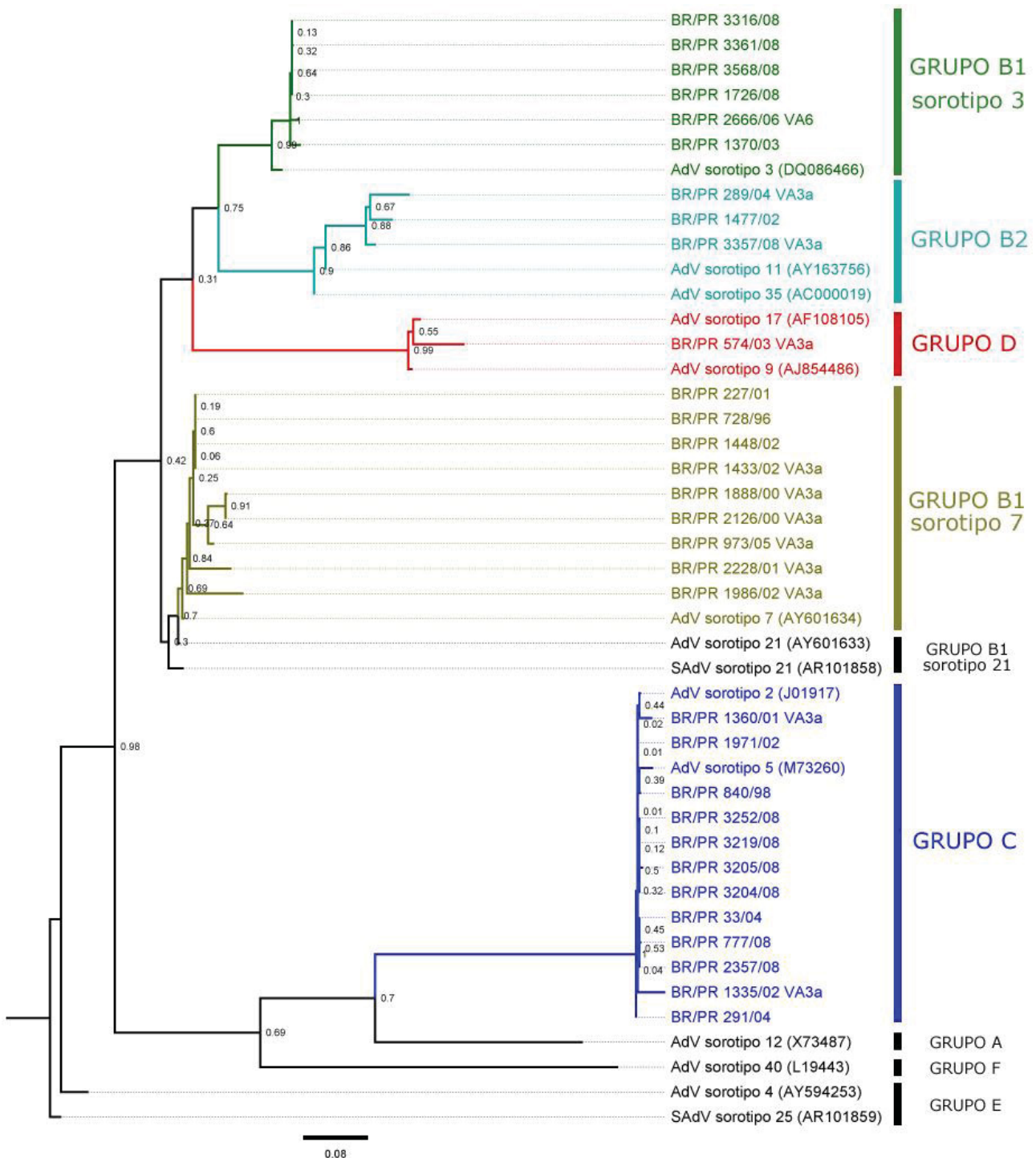


FIGURA 18 - ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA NO PROGRAMA GARLI UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DO GENE VA-RNA PARA DIFERENTES GRUPOS E TIPOS DE HADV

NOTA: Os valores de suporte dos ramos são referentes a 1000 réplicas de *bootstrap*

FONTE: O autor (2011)

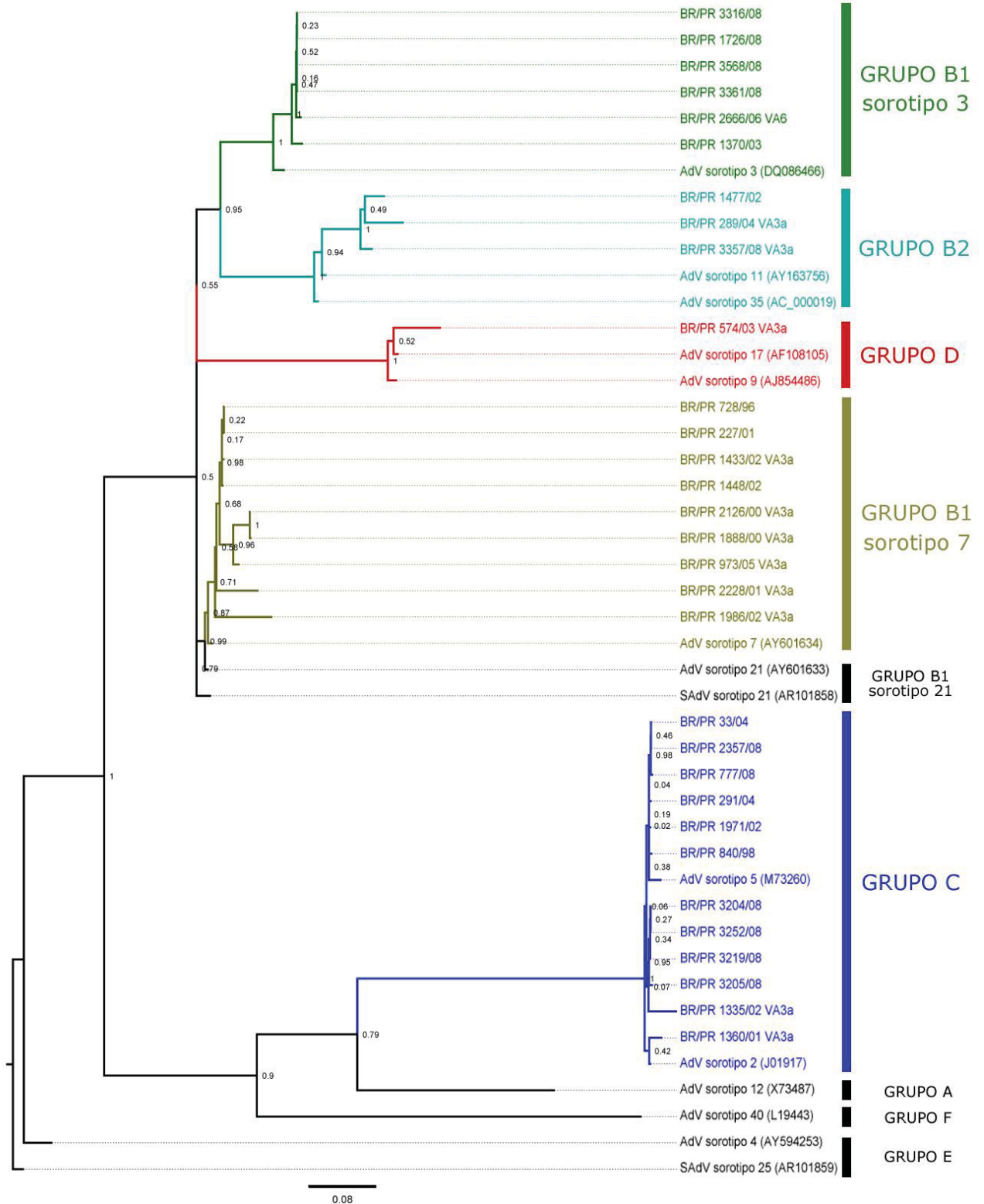


FIGURA 19 - ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR INFERÊNCIA BAYESIANA NO PROGRAMA *BEAST* UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DO *GENE VA-RNA* PARA DIFERENTES GRUPOS E TIPOS DE HADV

NOTA: Os valores de suporte dos ramos são referentes aos valores de probabilidade posterior

FONTE: O autor (2011)

QUADRO 7 - AMOSTRAS SEQUENCIADAS NESTE ESTUDO E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK

Amostra	Número de acesso no <i>GenBank</i>
BR/PR 728/96	A ser depositado
BR/PR 840/98	A ser depositado
BR/PR 1888/00	A ser depositado
BR/PR 2126/00	A ser depositado
BR/PR 227/01	A ser depositado
BR/PR 1360/01	A ser depositado
BR/PR 2228/01	A ser depositado
BR/PR 1335/02	A ser depositado
BR/PR 1433/02	A ser depositado
BR/PR 1448/02	A ser depositado
BR/PR 1477/02	A ser depositado
BR/PR 1971/02	A ser depositado
BR/PR 1986/02	A ser depositado
BR/PR 574/03	A ser depositado
BR/PR 1370/03	A ser depositado
BR/PR 33/04	A ser depositado
BR/PR 291/04	A ser depositado
BR/PR 289/04	A ser depositado
BR/PR 973/05	A ser depositado
BR/PR 2666/06	A ser depositado
BR/PR 777/08	A ser depositado
BR/PR 1726/08	A ser depositado
BR/PR 2357/08	A ser depositado
BR/PR 3204/08	A ser depositado
BR/PR 3219/08	A ser depositado
BR/PR 3252/08	A ser depositado
BR/PR 3205/08	A ser depositado
BR/PR 3568/08	A ser depositado
BR/PR 3361/08	A ser depositado
BR/PR 3316/08	A ser depositado
BR/PR 3357/08	A ser depositado

FONTE: O autor (2011)

A realização das três réplicas da análise Bayesiana foi completada em 13 horas e 30 min, sendo necessárias cerca de 4 horas adicionais para as análises de convergência e obtenção da árvore de consenso. As três réplicas da análise por inferência Bayesiana apresentaram valores de ESS (*estimated sample size*) maiores que 250 e apresentaram traços convergentes. A análise utilizando os Fatores de Bayes indicou que não houve diferenças significativas entre os valores de verossimilhança das três réplicas.

Como não houve diferenças entre as réplicas, as árvores destas foram combinadas, e após a exclusão de 10% das árvores iniciais, foi obtido um total de 38.002 árvores, as quais foram utilizadas para a obtenção da árvore de consenso e dos valores de probabilidade posterior. A árvore de consenso da Inferência

Bayesiana é apresentada na Figura 19. Na análise Bayesiana os diferentes grupos de HAdV também foram bem suportados (maior ou igual a 0,9), porém vários ramos apresentaram valores baixos de probabilidade posterior (suporte); novamente com o padrão de ramificação dentro dos grupos apresentando baixo suporte.

#### 4.4 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS DO HC-UFPR INFECTADOS POR HAdV

Foram analisados os prontuários médicos dos 33 pacientes internados nas unidades pediátricas do HC-UFPR entre os anos de 1996 a 2008, cujas amostras de ANF foram positivas para HAdV.

Vinte pacientes (60,6%) eram do sexo masculino, a idade mediana foi de 10 meses, variando de 3 a 118 meses e a maior parte (85,0%) tinha idade inferior a 2 anos (Tabela 9).

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS 33 PACIENTES COM HAdV POSITIVO

Variável	n	%
Gênero		
Masculino	20	60,6
Feminino	13	39,4
Faixa etária		
≤ 6 meses	9	27,3
6 a 12 meses	14	42,4
12 a 24 meses	5	15,2
≥ 24 meses	5	15,2

FONTE: O autor (2011)

As manifestações clínicas da infecção pelo HAdV observadas com maior frequência no exame de admissão hospitalar foram: taquipneia (93,9%), esforço respiratório (84,8%), febre (84,8%), taquicardia (81,8%) e tosse (75,8%).

Os diagnósticos atribuídos a esses pacientes foram principalmente bronquiolite e traqueobronquite, em igual proporção. Uma ou mais comorbidades estavam presentes em 14 (42,4%) pacientes, sendo a história de prematuridade a mais frequente, seguida de doença hemato-oncológica (Tabela 10).

Casos de coinfeção entre HAdV e outros vírus respiratórios foram detectados em 6 (18,2%) amostras e ocorreram em crianças com idade inferior a um

ano (100%). Os vírus detectados nestes casos de coinfeção foram: vírus sincicial respiratório (dois casos), influenza A (um caso), influenza B (um caso), parainfluenza 1 (um caso) e parainfluenza 3 (um caso).

A antibioticoterapia foi administrada em 26 pacientes (78,8%), broncodilatadores foram usados em 29 crianças (87,8%) e corticoides foram prescritos para 18 pacientes (54,5%).

TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS 33 PACIENTES COM HA<sub>2</sub>V POSITIVO

Variável	n	%
Manifestações clínicas		
Taquipneia	31	93,9
Esforço respiratório	28	84,8
Febre	28	84,8
Taquicardia	27	81,8
Tosse	25	75,7
Vômito	11	33,3
Gemência	10	30,3
Coriza	8	24,2
Cianose	7	21,2
Diarreia	6	18,2
Apneia	2	6,0
Diagnósticos clínicos		
Bronquiolite	11	33,3
Traqueobronquite	11	33,3
Broncopneumonia	10	30,3
Crise de Asma	1	3,0
Co-morbidades		
Sim	14	42,4
Prematuridade	13	39,4
Doença hemato-oncológica*	5	15,1
Síndrome de Down	1	3,0

FONTE: O autor (2011)

NOTA1:\*(2 casos de Síndrome de Wiskott Aldrich, 2 casos de leucemia linfocítica aguda e 1 caso de histiocitose).

NOTA 2: Presença de uma ou mais comorbidades nos 14 pacientes.

Quatorze crianças foram internadas na Unidade de Terapia Intensiva (42,4%) por um tempo que variou de 3 a 33 dias, com mediana de seis dias. Treze dessas crianças tinham idade inferior a dois anos (sendo 10 com idade inferior a um ano) e seis tinham uma ou mais comorbidades (quatro com história de prematuridade, uma com Síndrome de Down e prematuridade e uma com histiocitose). Observou-se que 42,8% (6/14) dos pacientes com comorbidades e 42,1% (8/19) daqueles sem comorbidades necessitaram de cuidados intensivos, sem diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,96$ ).

O tempo mediano de internação foi de nove dias, variando de três a 134 dias. Observou-se que o tempo mediano de internação dos pacientes com comorbidades foi de 8,5 dias, comparado com nove dias daqueles sem comorbidades, sem diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,62$ ).

Ocorreram 12 óbitos (36,4%), sendo nove em crianças com idade inferior a dois anos. Oito crianças que evoluíram com óbito apresentavam uma ou mais comorbidades, principalmente prematuridade (7), doença hemato-oncológica (3) e Síndrome de Down (1). O óbito ocorreu em 57,14% (8/14) e 21,0% (4/19) das crianças com e sem comorbidades, respectivamente ( $p=0,03$ ). O tempo mediano de internação dos pacientes que foram a óbito comparado com os que não foram a óbito foi semelhante (10,5 e 8 dias, respectivamente;  $p = 0,15$ ).

Em relação aos subgêneros de HAdV pesquisados nas amostras dos 33 pacientes pediátricos hospitalizados, verificou-se uma prevalência do subgênero B:1 pelas análises de enzima de restrição e sequenciamento. A infecção por B:1 foi confirmada em 17 casos (51,5%), pelo subgênero C em 12 casos (36,4%), pelo subgênero B:2 em três casos (9,1%) e pelo subgênero D em um caso (3,0%).

Procurando avaliar a associação do subgênero viral com evolução para gravidade de doença, comparou-se o subgênero de HAdV identificado com necessidade de internação em UTI, óbito e tempo total de internação.

Observou-se que necessidade de internação em UTI e óbito ocorreram em 58,33% e 57,14% dos pacientes com subgênero B:1, respectivamente (Tabela 11).

TABELA 11 - SUBGÊNEROS DE HAdV IDENTIFICADOS E EVOLUÇÃO PARA INTERNAÇÃO EM UTI E ÓBITOS

	B:1 n= 17		B:2 n= 3		C n= 12		D n= 1		Valor de p*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Necessidade de UTI	8	58,33	-	-	5	35,71	1	7,14	0,29
Óbito	7	57,14	1	8,33	4	33,33	-	-	0,84

FONTE: O autor (2011)

NOTA: \*Teste exato de Fisher

Avaliando os óbitos em relação aos sorotipos do subgênero B:1, observou-se que quatro crianças apresentavam infecção pelo sorotipo 7 e três crianças pelo sorotipo 3. O tempo mediano de internação dos pacientes com os subgêneros B:1, B:2, C e D foram 11; 4; 8,5 e 5 dias, respectivamente, sem diferença entre os grupos ( $p = 0,19$ ).

Como o subgênero B:1 foi o mais identificado, compararam-se essas mesmas variáveis (necessidade de internação em UTI, óbito e tempo de internação) entre este subgênero e todos os outros subgêneros agrupados (B:2; C e D). Não se observou diferença estatística na análise dessas variáveis entre esses grupos ( $p = 0,57$ ;  $p = 0,55$ ;  $p = 0,08$ , respectivamente).

Quanto à sazonalidade, considerou-se os dados de 2008, os quadros de IRA causados pelo HAdV ocorreram em todas as estações do ano em Curitiba (Figura 20), com uma concentração de amostras positivas nos meses de março, novembro e dezembro. A análise da relação entre a precipitação pluviométrica e a média da temperatura mensal diante do número de casos de HAdV na cidade de Curitiba, verifica-se que os casos desta enfermidade apresentaram, no decorrer do período estudado, uma variação interanual. Quanto à sazonalidade da doença, nota-se uma maior concentração nos meses de março, novembro e dezembro quando a temperatura se apresenta em torno de 19°C em período pouco chuvoso (meses de novembro e dezembro).

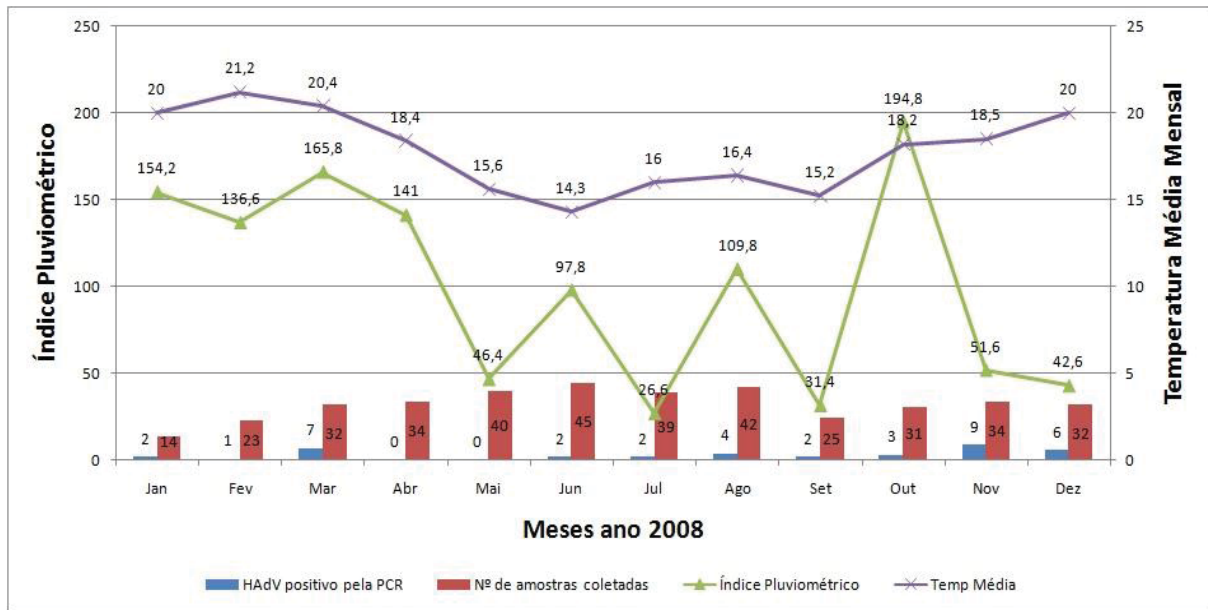


FIGURA 20 - FREQUÊNCIA MENSAL DOS CASOS DE HAAdV DETECTADOS POR PCR EM CURITIBA, PARANÁ, NO ANO DE 2008, DO ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO E MÉDIA TEMPERATURA MENSAL

NOTA: Os dados sobre o índice pluviométrico e temperatura mensal foram cedidos pelo Instituto Tecnológico SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná)

FONTE: O autor (2011)

## 5 DISCUSSÃO

Os HAdV são causas frequentes de IRA em crianças que apresentam uma ampla variedade de sinais e sintomas, indistinguíveis de outras etiologias virais ou bacterianas. Essas infecções são potencialmente graves, especialmente em pacientes com determinadas condições preexistentes.

Embora os tratamentos antivirais específicos para o HAdV ainda sejam incipientes, o diagnóstico precoce dessa situação clínica permite uma abordagem terapêutica, suportiva e prognóstica mais adequada, além de desencadear medidas de controle de disseminação do agente no ambiente hospitalar.

A introdução de técnicas para caracterização genética dos HAdV em laboratórios de virologia e (ou) biologia molecular pode contribuir sobremaneira para o desencadeamento rápido das medidas de controle da disseminação de sorotipos altamente virulentos, principalmente em setores de atendimento a pacientes críticos como unidades de transplante de medula óssea, terapia intensiva adulto, pediátrica e neonatal.

Com a finalidade de otimizar o diagnóstico das infecções respiratórias por HAdV, um dos principais objetivos desta pesquisa foi a padronização da técnica de detecção genética do HAdV para introdução na rotina do laboratório de virologia da Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD) do Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR. Essa necessidade vem ao encontro das características assistenciais do hospital: é o maior hospital do Estado do Paraná, que presta assistência de média e alta complexidade a pacientes usuários do Sistema Único de Saúde. O HC é o hospital de atendimento terciário de referência para situações clínicas como doenças infecciosas, transplante de órgãos sólidos, transplante de medula óssea e cuidado intensivo adulto, pediátrico e neonatal.

Assim, foi padronizada e implantada, na rotina do setor de Virologia do HC-UFPR a técnica *nested* PCR para HAdV, empregando iniciadores do genoma do HAdV codificadora da proteína hexon, de acordo com as sequências previamente disponíveis em bases de dados genômicos. Conhecendo a complexidade das técnicas de biologia molecular, buscou-se padronizar uma reação que pudesse ser realizada de maneira simplificada e que fosse facilmente reproduzida em laboratórios com recursos mínimos para a realização do teste. A padronização da PCR requer processamento criterioso das amostras para evitar intercorrências que

podem interferir nos resultados do teste. A vantagem da *nested* PCR é que a segunda amplificação confere maior especificidade à técnica, paralelamente observa-se também uma maior sensibilidade, uma vez que maior concentração de produto é obtida resultando em melhor visualização do produto amplificado no gel de agarose. O DNA obtido a partir da extração realizada em amostras de ANF foi amplificado para detectar uma região do gene hexon do capsídeo do HAdV apresentando um tamanho 168 pares de base (Avellón *et al.*, 2001).

Em 2007, o laboratório de virologia apresentava 0,7 a 2% de positividade para o HAdV, com a implantação da PCR esta positividade passou para 10%. O serviço não realiza mais a IFI e o Cultivo celular é somente utilizado para pesquisa. A PCR melhorou muito o diagnóstico das infecções respiratórias, visto que no serviço foi introduzida PCR para 15 diferentes vírus.

Uma análise do desempenho e, principalmente, do aumento de detecção do HAdV em amostras provenientes do trato respiratório de crianças hospitalizadas com IRA, após a introdução desta técnica de biologia molecular, foi publicada em um artigo em 2010 com o título “Infecção respiratória por HAdV: aumento significativo no diagnóstico utilizando PCR em comparação com a detecção de antígenos e métodos de cultura” (Apêndice VIII). Entre as 381 amostras de aspirados de nasofaringe coletadas no ano de 2008, 46 foram positivas por PCR e (ou) IFI, e em 11 o HAdV foi isolado em cultivo celular. O isolamento viral é tido como padrão-ouro e apresenta uma sensibilidade superior aos métodos de pesquisa como a IFI. A cultura, apesar de apresentar alta especificidade, demanda tempo até a obtenção do resultado, tempo que geralmente não é disponível em função da condição clínica do paciente. Entretanto, o baixo isolamento (recuperação viral) observado nesta pesquisa pode ter várias justificativas: é possível que as amostras apresentassem pequena quantidade de vírus, inviabilidade dos vírus presentes nos espécimes clínicos, o muco é um inibidor impossibilitando a recuperação dos vírus nas amostras, o congelamento e descongelamento das amostras pode ter alterado algumas estruturas virais, como o hexon, apresentando baixa expressão viral e por conseguinte baixo rendimento e não visualização do ECP. É importante lembrar que as amostras de 1996 a 2007 não eram armazenadas em sobrenadante de cultura e sim congeladas sem processamento contem muitos inibidores, pois a secreção de nasofaringe apresenta muitas bactérias e a possibilidade de recuperar o vírus, nestas condições, torna-se inviável. Segundo Henrickson (2004), alguns dos fatores

que levam a resultados negativos em cultura podem estar relacionados com: baixo número de cópias virais na amostra clínica, presença de inibidores na amostra, seleção inadequada da amostra, bem como seu envio, conservação e processamento corretos. White e Fenner (1994) relataram que o tempo para desenvolvimento do efeito citopático é variável; depende do subgênero de HAdV, da concentração do agente infeccioso no espécime e da sensibilidade da célula hospedeira. O efeito citopático típico geralmente ocorre na segunda semana para os HAdV 1-3 e 5-7, enquanto para os outros, particularmente dos subgêneros A e D, o aparecimento das alterações celulares pode ocorrer após um período de 20 a 28 dias. Possivelmente este fato não ocorreu no presente estudo, uma vez que o cultivo celular foi acompanhado durante um período de 30 dias para todas as amostras inoculadas, antes de serem descartadas.

O efeito citopático não significa replicação viral, é evidencia que há a presença da proteína hexon. Os laboratórios que tem as melhores taxas de isolamento de vírus respiratórios são os que possuem duas a três linhagens de células permissíveis ao vírus a ser pesquisado.

As amostras foram isoladas em cultivo celular uma vez que para realizar a identificação de subgêneros do HAdV utilizou-se a técnica proposta por Kidd *et al.* (1996). Esses autores realizavam a caracterização após cultivo celular, a fim de aumentar a quantidade de vírus para a análise de restrição enzimática. Para análise diagnóstica foi utilizada a região codificadora do gene hexon e para a análise dos subgêneros o gene VA-RNA, pois esta é hipervariável, ou seja, apresenta variabilidade para os subgêneros, sendo uma boa região para realizar a metodologia de enzima de restrição, porém não se pode afirmar o mesmo para o sequenciamento pelo fato da dificuldade de alinhamento das amostras para efetuar a filogenia e chegar aos subgêneros.

Optou-se pelo gene VA-RNA devido ao trabalho de Kidd *et al.*, (1996) que contou com um grande número de amostras analisadas. Como não tínhamos idéia de que subgêneros iríamos encontrar, escolhemos trabalhar com a região VA-RNA. Porém, na literatura, faltam dados para informar qual é a melhor região a ser estudada para o adenovírus.

No presente estudo não foi possível comparar os resultados de IFI e PCR com cultivo celular, uma vez que não foram inoculadas as 381 amostras, mas somente as 46 amostras que resultaram positivas para IFI e (ou) PCR. Porém, para

o ano de 2008 conseguimos recuperar 11 amostras por isolamento em cultivo celular, se comparado com os anos de 1996 a 2007, onde foi recuperado de uma a seis amostras, isso pode ser devido ao fato de menor tempo de congelamento das amostras no ano de 2008.

No entanto, para alguns dos resultados observados ocorreu positividade para IFI com isolamento em cultura e PCR negativos. Isso pode ter acontecido devido ao fato de o isolamento em cultivo celular e PCR não terem sido realizados no mesmo período da IFI e, conseqüentemente, pode ter ocorrido perda de viabilidade viral após descongelamento. Outra possibilidade a ser considerada seria um resultado falso-positivo pela IFI. Para Fan e Henrickson (1996), a detecção de antígeno viral por IFI é rápido, mas muitas vezes falta sensibilidade e especificidade na detecção de alguns vírus respiratórios. Outros autores descrevem que vários fatores podem ter contribuído para subestimar a identificação viral no presente estudo, como a sensibilidade do método de IFI para HAdV. Também o tempo de duração do quadro viral pode ter interferido na identificação do vírus, uma vez que a IFI apresenta melhor rendimento quando executada em até 48 horas do início dos sintomas (MADELEY, PEIRIS, 2002; KUYPERS *et al.*, 2006; NOLTE *et al.*, 2007).

Considerando IFI como padrão-ouro foram verificadas uma sensibilidade de 40% e especificidade de 90% para a PCR. Deve-se ressaltar a limitação desta análise, uma vez que foi utilizada como padrão-ouro a metodologia de IFI, que sabidamente apresenta sensibilidade e especificidade inferiores à cultura celular, técnica que também apresenta limitações, conforme previamente citado. Além disso, ao comparar os resultados das técnicas de IFI e PCR, observou-se uma concordância muito pobre ( $kappa = 0,13$ ). Dessa forma, análises das características operacionais dos novos métodos de biologia molecular desenvolvidos, e que atualmente estão sendo empregados no diagnóstico virológico, têm sido observadas com certa restrição. As características operacionais entre as técnicas IFI e PCR foram calculadas para 377 amostras, das 381 amostras de 2008. As características operacionais devem somente ser calculadas com os resultados positivos e negativos. Foram excluídas, para a realização do cálculo, quatro amostras, devido aos seguintes fatos: duas amostras não foram realizadas por IFI e outras duas amostras deram resultado indeterminado para IFI, semelhante ao encontrado por outros autores, que mencionam que ensaios moleculares têm sido considerados novos padrões para a detecção de vírus respiratórios (SYRMIS *et al.*, 2004;

TEMPLETON *et al.*, 2005; NOLTE, *et al.*, 2007). A sensibilidade e especificidade, de métodos moleculares já publicadas, são próximas a 100% se comparadas com cultivo celular ou com ensaios baseados em antígenos como a IFI (HENRICKSON, 2003). Kehl e Henrickson (2001) demonstraram que, ao comparar ensaios moleculares com cultivo celular, a sensibilidade aumenta significativamente (de 12 a 30%).

No presente estudo, das 46 amostras de ANF positivas para HAdV, foi demonstrado que a cultura de células apresentou uma maior sensibilidade do que a IFI e uma menor sensibilidade do que os resultados da PCR. Houve um aumento de 2% para 10% na detecção de HAdV em amostras clínicas, comparando os resultados de IFI e PCR. A PCR, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, é capaz de produzir resultados em poucas horas e tem contribuído para uma rápida identificação do HAdV. No entanto, resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação, podem ser observados relacionados a esta técnica.

Nos últimos anos tem havido um número crescente de publicações sobre o incremento que as técnicas de biologia molecular trouxeram para o diagnóstico de infecções respiratórias virais, as quais serão provavelmente os métodos padrão-ouro em testes laboratoriais de rotina (NOLTE *et al.*, 2007).

A determinação dos subgêneros, no presente estudo, foi feita por restrição enzimática e também por sequenciamento genético. Em sete amostras não foi possível a determinação do subgênero por restrição enzimática, ou seja, houve dificuldade na obtenção de bandas após a digestão. Isso pode ter ocorrido pelo fato de o material genético estar contaminado por reagentes de extração impedindo a digestão com a enzima de restrição, uma das amostras era do subgênero D, determinada por sequenciamento, nesta amostra a enzima de restrição não funcionou pelo fato de não haver o sítio de restrição para que ocorresse a digestão. Wise *et al.* (2005) demonstraram que a presença de mutações e (ou) variabilidade genética em determinados pontos de clivagem no genoma de alguns isolados virais resulta em diferentes padrões de clivagem, quando analisados em gel de agarose. Uma limitação importante do método é que a presença da mutação só será detectada se ocorrer exatamente em um dos locais reconhecidos e clivados pelas enzimas utilizadas. O uso de várias enzimas simultaneamente aumenta a probabilidade de detecção de mutações em um determinado genoma ou parte do genoma. Segundo Li *et al.* (2005), a desvantagem desse método está na

necessidade de uma grande quantidade de DNA purificado; por tal motivo, o material deve ser previamente amplificado por PCR.

Ao obter a determinação dos subgêneros por sequenciamento genético, verificou-se que ocorreu discordância entre as determinações em duas das amostras analisadas por restrição enzimática. Houve dúvida quanto ao resultado verificado no gel, para o subgênero B (não distinção entre B:1 e B:2 devido à proximidade das bandas). A análise por restrição enzimática seguindo o protocolo de Kidd *et al.* (1996) estava muito indefinida devido ao fato de os autores não colocarem nas análises dos géis o padrão de peso molecular, dificultando a reprodução da técnica. Assim, dentre as 33 amostras analisadas por enzima de restrição não foi possível clivar sete amostras, além disso em duas amostras houve dificuldade na diferenciação dos subgêneros B:1 e B:2.

Nesses casos (30% das amostras), levou-se em consideração o resultado do sequenciamento genético, uma vez que este realiza a identificação de cada nucleotídeo na cadeia de DNA, sendo um método de diagnóstico mais fidedigno. O trabalho com enzima de restrição pode apresentar algumas limitações, tais como: necessidade de isolamento viral antes de aplicar a metodologia de digestão do material genético; armazenamento a -20°C (fora do freezer devem ser colocadas em banho de gelo); pureza do material genético; verificação das necessidades de cada enzima como o tempo para a reação e temperatura ótimas para que aconteça a clivagem do material genético.

Após sequenciamento genético, 17 amostras eram subgênero B:1, três amostras subgênero B:2, 12 amostras subgênero C e uma delas subgênero D. Para a determinação do subgênero C, a restrição enzimática forneceu resultados confiáveis, uma vez que não houve dificuldade em determinar as bandas no gel. Um fato inesperado foi ter encontrado o subgênero D em quadro de IRA, comumente identificado em amostras de fezes, secreção genital e conjuntiva e não de secreção respiratória (RABONI *et al.*, 2003). Segundo López e Martínez (2007), isso poderia estar relacionado com fatores como a idade do hospedeiro em que se apresenta a infecção, bem como o tipo de linhagem celular utilizada para o isolamento.

Contudo, apesar das dificuldades encontradas pode-se considerar que a técnica de restrição enzimática, quando rigorosamente executada, produz bons resultados não havendo a necessidade de implantar o sequenciamento na rotina

laboratorial. Neste estudo o sequenciamento foi utilizado para realizar a análise filogenética.

Realizou-se a análise filogenética de 31 (94%) amostras positivas para HAdV. Todas as amostras apresentaram grande similaridade às sequências previamente depositadas no *GenBank*, o que permitiu confiabilidade a sua identificação em subgêneros. Para as amostras do subgênero B:1, foi possível associá-las aos tipos 3 ou 7.

Neste estudo, as sequências obtidas para o gene VA-RNA se encontraram dentro dos padrões esperados. O gene VA-RNA tem como função inibir a ativação da proteína celular kinase (PKR) (MA, MATHEWS, 1996), sendo encontrada uma alta variabilidade associada aos diferentes grupos e tipos. Tais características demonstram como as sequências são altamente conservadas tanto no comprimento quanto na composição de aminoácidos, conforme já observados para outras partes do genoma dos HAdV (CRAWFORD-MIKSZA, SCHNURR, 1996).

Adicionalmente, tal especificidade do gene VA-RNA, em diferentes subgêneros e tipos, parece refletir o fato que os diferentes subgêneros de HAdV podem ter distintos mecanismos moleculares de infecção e evasão do sistema imune dos hospedeiros, como tem sido demonstrado por diversos estudos (BERGELSON *et al.*, 1997; ROELVINK *et al.*, 1998; SIRENA *et al.*, 2004; PACHE *et al.*, 2008).

Os HAdV mais comumente encontrados associados à IRA são os que pertencem ao subgênero C (HAYASHI, HOGG, 2007), que também foi um dos mais encontrados nas amostras obtidas de pacientes do HC-UFPR. Este estudo demonstrou a detecção dos subgêneros B (tipos 3 e 7), C e D, em concordância com o que alguns autores encontraram, como Wadell (1988) e Moura *et al.* (2007).

A alta divergência de nucleotídeos entre as amostras do subgênero B:1 para os sorotipos 3 (5%) e 7 (3%) devem estar associadas a uma taxa de mutação maior do que a encontrada nos subgêneros B:2 e C (< que 1%). Tal característica dos tipos 3 e 7 pode ser a responsável, segundo alguns autores, pela evolução para maior gravidade do quadro clínico, com frequência associada com sequelas tardias, como bronquiolite obliterante e bronquiectasia (WHITE, FENNER, 1994).

Os resultados obtidos sugerem uma mudança na prevalência dos tipos. De 1996 a 2002 foram encontradas apenas amostras relacionadas ao tipo 7, com somente uma ocorrência ocasional desse sorotipo após tal data (amostra BR/PR

973/05). A partir de 2003 todas as amostras obtidas do subgênero B:1 foram relacionadas ao tipo 3. Moraes *et al.* (1997) observaram que, no Brasil, durante alguns anos o variante 7b foi o mais detectado.

Todas as amostras foram alocadas para os seus respectivos grupos e no caso do subgênero B:1, conseguiu-se alocar para os tipos 3 e 7, o que sugere que uma matriz utilizando apenas o gene VA-RNA já permite, até certo grau, a identificação dos HAdV. Já para os subgêneros B:2, C e D, a identificação dos sorotipos não foi possível, conseguindo-se alocar apenas para o grupo que pode ter ocorrido devido à grande similaridade genética dentro de cada um destes subgêneros.

A identificação dos subgêneros B e C em amostras provenientes de pacientes com IRA tem sido comumente relatada em humanos e primatas não humanos, conforme observado por Benkö e Harrach (2003). A identificação do subgênero D, encontrado neste estudo, pode ser devido a inserções, deleções e rearranjos com o aparecimento de novos genes em um organismo sendo indicadores do nível de plasticidade genômica, importante para adaptação do parasito ao hospedeiro (MATIOLI, 2001), porém a análise realizada não permite comparar os achados com o previamente relatado.

Diante da caracterização genômica e evolução clínica, em relação à sintomatologia, este estudo mostra que é difícil caracterizar o subgênero de HAdV fazendo uso da clínica, pois os pacientes apresentam quadros respiratórios semelhantes independente do patógeno identificado, incluindo principalmente febre, tosse, taquipneia, respiração sibilosa, dispneia e esforço respiratório. Segundo Hein *et al.*, (2003) o diagnóstico hospitalar das infecções virais pode ter importância para a utilização de drogas antivirais, para o isolamento de pacientes e para controle epidemiológico. Do ponto de vista clínico não se faz necessário caracterizar o HAdV genomicamente pelo fato de ser um diagnóstico, porém, para a vigilância epidemiológica tal fato é de grande relevância para que ocorra conhecimento do tipo de HAdV que esta circulando a fim de empregar medidas de precaução e isolamento do paciente.

Quanto às características clínicas dos pacientes incluídos neste estudo, observou-se que o HAdV afetou principalmente crianças com idade inferior a dois anos (85%) e do gênero masculino (60,6%). HONG *et al.*, (2001) relataram que a incidência de infecção por HAdV é inversamente relacionada à idade e ocorre

principalmente em crianças de seis meses a cinco anos de idade. A infecção é infrequente em lactentes menores de seis meses devido à presença de anticorpos maternos protetores (HUQ *et al.*, 1990; VIDELA *et al.* 1998). A predominância do gênero masculino na população estudada também é fato documentado por diversos autores em várias partes do mundo (VIDELA *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2001), embora alguns estudos não confirmem esse achado (HUQ *et al.*, 1990).

Na presente pesquisa, as manifestações clínicas mais frequentes da infecção pelo HAdV encontradas nos registros dos pacientes foram: taquipneia, esforço respiratório, febre, taquicardia e tosse. Ruuskanen, Meurman e Sarkkinen (1985) e Rocholl *et al.* (2004) definiram como critérios clínicos para diagnóstico de infecção respiratória a taquipneia, angústia respiratória, febre, hipoxemia, tosse e dispneia, sinais e sintomas estes, comuns a diferentes agentes etiológicos.

Os fatores de risco (ou comorbidades) para IRA encontrados neste estudo estão relacionados à história de prematuridade, doenças hemato-oncológicas e Síndrome de Down. Bohland e Jorge (1999) apontam vários fatores de risco que contribuem para o aumento da incidência e (ou) da gravidade das doenças respiratórias em crianças como prematuridade, doenças de base, especialmente aquelas que afetam os sistemas cardiopulmonar, imunológico ou neuromuscular, que também aumentam o risco para desenvolvimento de quadros mais graves. Os dados apontados por este estudo vão ao encontro dos resultados apresentados pelos autores citados.

Os casos de coinfeção entre HAdV e outros vírus respiratórios foram detectados em seis (18,2%) amostras e ocorreram principalmente em crianças com idade inferior a um ano (100,0%). Os casos de coinfeção foram por RSV, FLUA, FLUB, PIV1 e PIV3, similares aos relatados por Suara e Glezen (1995), que demonstraram que os principais vírus causadores de coinfeção em crianças jovens são semelhantes em países industrializados e em países em desenvolvimento.

A antibioticoterapia foi administrada em 78,8% dos pacientes. Segundo Ibiapina *et al.* (2004), existem duas questões sobre o manejo das IRA em pediatria: uma delas é a dificuldade em distinguir entre IRA bacteriana e viral e a segunda é a carência de estudos controlados e randomizados com guias de seleção do antimicrobiano a ser usado. Uma vez que raramente o clínico tem ao seu alcance o patógeno causador da IRA e os sinais e sintomas são semelhantes entre os diversos

agentes etiológicos, o tratamento geralmente é empírico e muitas vezes desnecessário.

No presente trabalho, os broncodilatadores foram usados em 87,8% das crianças e os corticóides foram prescritos em 54,5% dos casos. Teper, Fischer e Jones (2002) relataram que, como há desconhecimento das características do processo inflamatório pulmonar, e particularmente a sua duração, o uso de corticóide é mantido por longos períodos, com a intenção de reduzir a hiperreatividade brônquica inflamatória e broncoconstrição secundária a infecções virais e alergia. Por esse motivo, o tratamento das infecções respiratórias, feito por muitos centros, inclui corticóides orais e inalatórios e broncodilatadores. Os mesmos autores referem que os broncodilatadores têm indicação empírica, assim como os corticosteróides orais ou inalatórios; contudo, especialmente nos primeiros dois anos de vida, seu uso pode reduzir parcialmente os sintomas obstrutivos. Conforme Hale *et al.* (1999), a enfermidade por HAdV representa um desafio para os clínicos, pois ainda não há terapêutica específica para este agente.

Quatorze crianças (42,4%) necessitaram de internação em Unidade de Terapia Intensiva; destas, 13 tinham idade inferior a dois anos e não houve maior frequência deste tipo de internação entre as crianças com e sem comorbidades. Entretanto, observou-se que a taxa de letalidade foi maior entre as crianças com comorbidades. Segundo estudo de Bouso *et al.* (2002), na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, os casos admitidos de IRA por HAdV em conjunto com comorbidades corresponderam a taxas elevadas e a altos índices de letalidade. Considerando que aproximadamente 40% dos pacientes incluídos no presente estudo apresentavam uma ou mais comorbidades, incluindo doenças graves como leucemia, torna-se difícil avaliar o quanto da evolução clínica desfavorável pode ser atribuída somente ao HAdV.

A taxa de letalidade geral (36,4%) deste estudo foi semelhante à de Stralio *et al.* (2004), que encontraram uma taxa de letalidade de 25% para os casos de IRA por HAdV, sendo que as crianças que morreram de pneumonia ou bronquiolite apresentavam alguma comorbidade associada.

Os casos que evoluíram a óbito foram predominantemente dos subgêneros B:1 (quatro do tipo 7 e três do tipo 3) e C. Segundo Kajon e Wadell (1994), na América do Sul, a genotipagem das cepas de HAdV feita ao longo de vários anos mostrou que o genótipo 7h, uma nova variante de HAdV, era o agente infeccioso na

maioria dos casos graves e fatais. White e Fenner (1994) relataram que os HAdV estão relacionados a quadros pulmonares graves, principalmente quando há o envolvimento dos tipos 3 e 7. Hong *et al.* (2001) concluíram que a gravidade da infecção do trato respiratório inferior por HAdV varia de acordo com o sorotipo, idade, nível socioeconômico, fatores ambientais e doença de base (PHAM, BURCHETTE e HALE, 2003). A alta mortalidade observada entre as crianças infectadas com HAdV suporta a hipótese de que genótipos altamente patogênicos podem estar envolvidos (VIDELA *et al.*, 1998). No presente estudo não se pode associar gravidade com o tipo devido ao pequeno número de amostras. E devido ao fato de que estas crianças podem ter ido à óbito pelas comorbidades.

Avaliando o número de amostras coletadas de ANF em crianças no HC-UFPR e o número de amostras positivas para HAdV em 2008, observou-se que os casos ocorreram ao longo do ano, com uma maior identificação do agente nos meses de março, novembro e dezembro, porém não foi possível observar um padrão sazonal desta infecção. Videla *et al.* (1998) relataram que as infecções por HAdV podem ocorrer endemicamente durante todo o ano ou em epidemias. Doenças respiratórias epidêmicas por HAdV são comuns durante o inverno, primavera e início do verão.

Este estudo permitiu o reconhecimento da gravidade das infecções respiratórias por HAdV em crianças, especialmente naquelas com doenças de base. Considerando que a avaliação clínica não possibilita a diferenciação do HAdV de outros patógenos e que os testes de detecção de antígenos, como a IFI, às vezes são insuficientes para a definição etiológica devido à sua reduzida sensibilidade, além das dificuldades inerentes à técnica de cultivo celular, a PCR demonstrou ser uma ferramenta de grande utilidade para permitir o diagnóstico etiológico das infecções respiratórias agudas principalmente em crianças.

O emprego de métodos de diagnóstico molecular para IRAs virais poderá ser útil na redução do número e do período de hospitalizações, na racionalização do uso de antibióticos e na determinação terapia antiviral para casos específicos (MOURA *et al.*, 2003).

Ainda cabe considerar como limitações deste estudo:

- A forma de amostragem, pois as amostras de 1996 a 2007 eram congeladas não em sobrenadante de cultura, isso remeteu à baixa recuperação do vírus devido aos interferentes.

- A codeteção de dois vírus em algumas amostras, restringindo o diagnóstico clínico em saber qual dos dois agentes estava realizando a infecção propriamente dita.
- As comorbidades associadas à infecção por HAdV são outros fatores, pois pacientes com doenças de base estão em condições clínicas com uma elevada probabilidade para o óbito; estes pacientes não demonstraram significativa melhora nos sintomas, havendo a necessidade de um grupo de pacientes ambulatoriais para melhor definição dos casos de óbitos.
- Outro aspecto é a antibioticoterapia que foi administrada em 78,8% dos pacientes, sendo provável indício de infecção bacteriana no grupo estudado.
- Cabe salientar a dificuldade de análise dos prontuários quanto às informações e análise da gravidade, o que reforça a importância de realizar detalhada avaliação de todos os sintomas presentes nos pacientes, para então possibilitar adequada formulação diagnóstica.
- Um aspecto importante que interferiu na conclusão do estudo, foi trabalhar com a região VA-RNA, pois não foi adequado para realização da árvore filogenética, seria necessário refazer as análises, porém, amplificando o gene hexon e a partir dele estudar a filogenia. O estudo do gene VA-RNA funcionaria melhor em conjunto com estudo de outros genes. Quanto maior o tamanho do gene e mais conservado ele for, melhor será a análise filogenética, pois fica com menos *gaps*. O gene VA-RNA é hipervariável tornando difícil a montagem da árvore e até mesmo o alinhamento das sequências.
- Para o subgênero D em relação à sequência VA-RNA, não haviam sequências disponíveis no *GenBank* para os diversos tipos alocados neste subgênero.

## 6 CONCLUSÕES

Desde o ano de 2008 a técnica de *nested* PCR para detecção de HAdV foi introduzida na rotina do setor de Biologia Molecular/Virologia do HC-UFPR.

Os resultados da PCR demonstraram uma maior sensibilidade desta técnica em relação à IFI, contribuindo para um importante aumento percentual de detecção das infecções por HAdV em pacientes pediátricos com infecção respiratória aguda hospitalizados no HC-UFPR.

Todas as amostras isoladas submetidas à análise por restrição enzimática e sequenciamento nucleotídico foram identificadas e classificadas como pertencentes aos subgêneros B:1(51,5%), B:2 (9,1%), C (36,4%) e D (3%).

Não foi verificada associação entre o tipo viral e a gravidade da infecção nas amostras analisadas. As infecções por HAdV com IRA ocorreram predominantemente em crianças menores de dois anos e do sexo masculino. As internações em unidade de terapia intensiva foram necessárias para 42,4% dos pacientes e a letalidade foi de 36,4%. Os óbitos ocorreram principalmente em crianças prematuras, com idade inferior a dois anos e com comorbidades. Os subgênero que mais levaram à internação em UTI e à óbito foram B:1 e C.

Em síntese, este estudo contribuiu para conhecimento da distribuição da frequência dos subgêneros do HAdV no nosso meio e reitera que a análise do gene VA-RNA não apresenta boa confiabilidade e bom desempenho da análise para a genotipagem do HAdV. Mais investigações são necessárias, porém utilizando a região codificadora do hexon para ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genômica do HAdV no Paraná.

## REFERÊNCIAS

ABERLE, S.W.; ABERLE, J.H.; STEININGER, C.; MATTHES-MARTIN, S.; PRACHER, E.; POPOW-KRAUPP, T. Adenovirus DNA in Serum of Children Hospitalized Due to an Acute Respiratory Adenovirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 311-314, 2003.

ALDOUS, M.B.; HOLBERG, C.J.; WRIGHT, A.L.; MARTINEZ, F.D.; TAUSSIG, L.M. Evaporative cooling and other home factors and lower respiratory tract illness during the first year of life. Group Health Medical Associates. **American Journal Epidemiology**, v. 143, n. 5, p. 423-430, 1996.

ANDERSON, L.J.; HIERHOLZER, J.C.; TSOU, C.; HENDRY, M.R.; FERNIE, B.F.; STONE, Y.; McINTOSH, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strain with monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 626-633, 1985.

ANDREW, S.; DAY, D.; Mc GREGOR, D. Fatal adenoviral disease in siblings. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 17, p. 83-85, 1998.

ANVISA. Pediatria: Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar. Editora: **Anvisa**, Brasília, p. 40, 2006.

AOKI, V.; SOUSA, J.X.; FUKUMORI, L.M.I.; PÉRIGO, A.M.; FREITAS, E.L.; OLIVEIRA, Z.N.P. Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490 – 500, 2010.

ARNBERG, N.; PRING-AKERBLOM, P.; WADELL, G. Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor on Chang C Cells. **Journal of Virology**, v. 76, p. 8834 – 8841, 2002.

ARNBERG, N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting - Review. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, p. 165 – 178, 2009.

AVELINO, M.A.G.; GUTZMAN, R.L.; FUJITA, R.R.; PIGNATARI, S.; WECKX, L.L.M.; PONTES, P. Estudo do efeito do Cidofovir na papilomatose laríngea recorrente em crianças: relato preliminar. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 735 – 738, 2004.

AVELLÓN, A.; PÉREZ, P.; AGUILAR, J.C.; LEJARAZU, R.O.; ECHEVARRÍA, J.E. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 113–120, 2001.

BAILEY, A.; MAUTNER, V. Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. **Virology**, v. 205, n. 2, p. 438–452, 1994.

BAUM, G.S. Adv. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.C.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6 ed. Philadelphia: Elsevier; 2005, p. 1835 – 41.

BECROFT, D.M.O. Pulmonary sequelae of epidemic type 21 adenovirus infection: 1-13 year followup. **Archives of Disease in Childhood**, v. 54, p. 155–156, 1979.

BELOUSOVA, N.; KRENDELCHTCHIKOVA, V.; CURIEL, D.T.; KRASNYKH, V. Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. **Journal of Virology**, v. 76, p. 8621–8631, 2002.

BENKÖ, M.; HARRACH, B. Molecular evolution of adenoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 272, p. 3-35, 2003.

BENKÖ, M.; HARRACH, B.; BOTH, G.W.; RUSSELL, W.C.; ADAIR, B.M.; ÁDAM, É.; de JONG, J.C.; HESS, M.; JOHNSON, M.; KAJON, A.; KIDD, A.H.; LEHMKUHL, H.D.; LI, Q.G.; PRING-AKERBLOM, P.; WADELL, G. 2005. **Family Adenoviridae**, p. 213–228. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (ed.), **Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

BERGELSON, J.M.; CUNNINGHAM, J.A.; DROGUETT, G.; KURT-JONES, E.A.; KRITHIVAS, A.; HONG, J.S.; HORWITZ, M.S.; CROWELL, R.L.; FINBERG, R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. **Science**, v. 275, p. 1320–1323, 1997.

BERMAN, S. Epidemiology of Acute Respiratory Infections in Children of Developing Countries. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, (Suppl 6):S434-462, 1993.

BERNAOLA, G.; LUQUE, W. Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus. **Paediatrica**, v. 4, p. 41–47, 2002.

BIRNBAUM, H.G.; MORLEY, M.; GREENBERG, P.E.; COLICE, G.L. Economic Burden of Respiratory Infections in an Employed Population. **Chest**, v. 122, p. 603-611, 2002.

BOHLAND, A.K.; JORGE, M.H.P.M. Mortalidade infantil de menores de um ano de idade na região do sudoeste do estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 33, p. 366 – 373, 1999.

BOISVERT, F.M.; HENDZEL, M.J.; BAZETT-JONES, D.P. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. **The Journal of Cell Biology**, v. 148, p. 283–292, 2000.

BOUSSO, A.; BALDACCI, E.R.; FERNANDES, J.C.; FERNANDES, I.C.O.; CORDEIRO, A.M.G.; OTOCH, J.P.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Contribuição da biópsia pulmonar a céu aberto na avaliação de pneumopatias difusas e agudas em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 1, p. 30-40, 2002.

BUCKWALTER, S.P.; TEO, R.; ESPY, M.J.; SLOAN, L.M.; SMITH, T.F.; PRITT, B.S. Real-Time Qualitative PCR for 57 Human Adenovirus Types from Multiple Specimen Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 766–771, 2012.

CANDUCCI, F.; DEBIAGGI, M.; SAMPAOLO, M.; MARINOZZI, M.C.; BERRE, S.; TERULLA, C.; GARGANTINI, G.; CAMBIERI, P.; ROMERO, E.; CLEMENTI, M. Two-year prospective study of single infections and coinfections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 4, p. 716–723, 2008.

CASAS, I.; POWELL, L.; KLAPPER, P.E.; CLEATOR, G.M. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, v. 53, p. 25–36, 1995.

CATTANEO, R. Four Viruses, Two Bacteria, and One Receptor: Membrane Cofactor Protein (CD46) as Pathogens' Magnet. **Journal of Virology**, v.78, p. 4385–4388, 2004.

CHATTERJEE, N.K.; SAMSONOFF, W.A.; BALASUBRAMANIAM, N.; RUSH-WILSON, K.; SPARGO, W.; CHURCH, T.M. Isolation and characterization of adenovirus 5 from the brain of an infant with fatal cerebral edema. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 830–833, 2000.

CHONG, D.C.; , RABONI, S.M.; ABUJAMRA, K.B.; MARANI, D.M.; NOGUEIRA, M.B.; TSUCHIYA, R.V.; CHONG, H.J.; FLIZIKOWSKI, F.B.Z.; NORONHA, L. Respiratory Viruses in Pediatric Necropsies: An Immunohistochemical Study Pediatric and Developmental Pathology. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 12, n. 3, p. 211-216, 2009.

CHU, Y.; HEISTAD, D.; CYBULSKY, M.I.; DAVIDSON, B.L. Vascular cell adhesion molecule-1 augments adenovirus-mediated gene transfer. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 238–242, 2001.

COCKERILL, F.R. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 127, p. 1112–1120, 2003.

COHEN, C.J.; XIANG, Z.Q.; GAO, G.P.; ERTL, H.C.J.; WILSON, J.M.; BERGELSON, J.M. Chimpanzee adenovirus CV-68 adapted as a gene delivery vector interacts with the coxsackievirus and adenovirus receptor. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 151–155, 2002.

COLLIER, L.; KELLAM, P.; OXFORD, J. **Human Virology**. Fourth Edition. United States: Oxford University Press, 2011, p. 74–79.

COSTA, L.F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O.C.; OLIVEIRA, T.F.M.; SILVEIRA, H.L.; NEPOMUCENO, L.L.; MOREIRA, L.S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L.M.G.; OLIVEIRA, R.C.; RIBEIRO, L.Z.G.; QUEIRÓZ, D.A.O. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.3, p. 301–306, 2006.

CRAWFORD-MIKSZA, L.; SCHNURR, D.P. Analysis of 15 AdV hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. **Journal of Virology**, v. 70, p. 1836–1844, 1996.

CUBIE, H.A.; INGLIS, J.M.; LESLIE, E.E.; EDMUNDS, A.T.; TOTAPALLY, B. Detection of respiratory syncytial virus in acute bronchiolitis in infants. **Journal of Medical Virology**, v. 38, p. 283 – 287, 1992.

CUPELLI, K.; MÜLLER, S.; PERSSON, B.D.; JOST, M.; ARNBERG, N.; STEHLE, T. Structure of Adenovirus Type 21 Knob in Complex with CD46 Reveals Key Differences in Receptor Contacts among Species B Adenoviruses. **Journal of Virology**, v. 84, p. 3189–3200, 2010.

DALMÁS, S.; PEREYRA, M.L.; PÍREZ, M.C.; MATEOS, S.; VARELA, A.; CHIPARELLI, H.; MONTANO, A.; FERRARI, A. Infección respiratoria aguda baja por adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 74, n. 1, p. 15-21, 2003.

DAVISON, A.J.; BENKÖ, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2895–2908, 2003.

De CARVALHO, W.B.; JOHNSTON, C.; FONSECA, M.C. Bronquiolite Aguda, uma Revisão Atualizada. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 182-188, 2007.

De JONG, J.C.; WERMENBOL, A.G.; VERWEIJ-UIJTERWAAL, M.W.; SLATERUS, K.W.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; van DOORNUM, G.J.; KHOO, S.H.; HIERHOLZER, J.C. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3940–3945, 1999.

DINIZ, E.M.A.; VIEIRA, R.A.; CECCON, M.E.J.; ISHIDA, M.A.; VAZ, F.A.C. Incidence of respiratory viruses in preterm infants submitted to mechanical ventilation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 1, p. 37-44, 2005.

dos SANTOS, D.E.M.; CARDIAS, C.A.S. & MELLO, W.A. Inquérito soroepidemiológico para o vírus influenza em Belém, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 119–125, 1997.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **B.M.C. Evolutionary Biology**, v. 7, p. 214, 2007.

EBNER, K.; PINSKER, W.; LION, T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. **Journal of Virology**, v. 79, p. 12635–12642, 2005.

ECHAVARRIA, M.; FORMAN, M.; van TOL, M.J.D.; VOSSEN, J.M.; CHARACHE, P.; KROES, A.C.M. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. **Lancet**, v. 358, p. 384–385, 2001.

ENDERS, J.F.; BELL, J.A.; DINGLE, J.H.; FRANCIS, T. Jr.; HILLEMANN, M.R.; HUEBNER, R.J.; PAYNE, A.M. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. **Science**, v. 124, p. 119-120, 1956.

ERDMAN, D.D. ; XU, W. ; GERBER, S.I. ; GRAY, G.C.; SCHNURR, D.; KAJON, A.E.; ANDERSON, L.J. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966–2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 269–277, 2002.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E. Viral Pneumonia in Older Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 518–524, 2006.

FAN, J.; HENRICKSON, K.J. Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1914–1917, 1996.

FEIGIN, R., CHERRY, J. **Textbook of paediatric infectious diseases**. 4th ed: Philadelphia: WB Saunders Company, 1998.

FLEISCHLI, C.; SIRENA, D.; LESAGE, G.; HAVENGA, M.J.; CATTANEO, R.; GREBER, U.F.; HEMMI, S. Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2925–2934, 2007.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique**. New Jersey: Ed. Wiley-Liss, Fifth Edition, p. 121-125, 2005.

GAGGAR, A.; SHAYAKHMETOV, D.M.; LIEBER, A. CD46 is a cellular receptor for group B Adenoviruses. **Nature Medicine**, v. 9, p. 1408–1412, 2003.

GEVERS, D.; DAWYNTH, P.; VANDAMME, P.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; de VOS, P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 361, p. 1911-1916, 2006.

GAYDOS, C.A.; GAYDOS, J.C. Adenovirus vaccines in the U.S. military. **Journal Military Medicine**, v. 160, p. 300-304, 1995.

GOLDMAN, E.R.; ANDERSON, G.P.; TRAN, P.T.; MATTOUSSI, H.; CHARLES, P.T.; MAURO, J.M. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 841–847, 2002.

GRAY, C.G.; GOSWAMI, P.R.; MALASIG, M.D.; HAWKSWORTH, A.H.; TRUMP, D.H.; RYAN, M.A.; SCHNURR, D.P. Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 663–670, 2006.

GRONDAHL, B.; PUPPE, W.; HOPPE, A.; KUHNE, I.; WEIGL, J.A.; SCHMITT, H.J. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR, feasibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1-7, 1999.

HALE, G.A.; HESLOP, H.E.; KRANCE, R.A.; BRENNER, M.A.; JAYAWARDENE, D.; SRIVASTAVA, D.K.; PATRICK, C.C. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 23, p. 277-282, 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARFORD, C.G.; HAMLIN, A.; PARKER, E.; Van RAVENSWAAY, T.M.D. **Electron Microscopy of HeLa Cells Infected with Adenoviruses**. Publicado em Setembro de 1956. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/104/3/443.full.pdf+html> – Acesso em 09 de Setembro de 2011.

HAYASHI, S.; HOGG, J.C. Adenovirus infections and lung disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 237-243, 2007.

HAYWARD, S.D. Viral interactions with the Notch pathway. **Seminars in Cancer Biology**, v.14, p. 387–396, 2004.

HAZLETT, D.T.G.; BELL, T.M.; TUKEI, P.M.; ADEMBA, G.R.; OCHIENG, W.O.; MAGANA, J.M.; GATHARA, J.M.; WAFULA, E.M.; PAMBA, A.; NDINYA-ACHOLA, J.O. Viral etiology of acute respiratory infections in children in Nairobi, Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, p. 632-640, 1988.

HEIN, N.; SANTOS, N.C.; CACHARRO, A.L.; LOPES, C. De L.B.C.; GOMES, M.C.S.; DURIGON, E.L.; GILIO, A.E.; EJZENBERG, B. A coleta simultânea de *swab* nasal e do aspirado de nasofaringe para pesquisa de vírus respiratórios em crianças hospitalizadas. **Pediatria** (São Paulo), v. 25, p. 84-90, 2003.

HENRICKSON, K.J. Parainfluenza viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 242-264, 2003.

HENRICKSON, KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 2004; S6 - S10.

HIERHOLZER, JC; WIGAND, R; ANDERSON, LJ; ADRIAN, T; GOLD, JW. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of 5 new serotypes of subgenus D (types 43-37). **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, p. 804-813, 1988.

HIERHOLZER, J.C. Adenoviruses. Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections, 6a edição . Em Schmidt, N.J.; Emmons, R.W. (ed). **American Public Health Association**, Inc. Washington, D.C., p. 219-264, 1989.

HIERHOLZER, J.C. *Adenovirus*. **Manual de Microbiologia Clínica**, quinta edição. 1991; Capítulo 86. Balows, A.; Hausler, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shadomy, H.J.

HIERHOLZER, J.C. Adenovirus in the immunocompromised host. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, p. 262–274, 1992.

HILLEMAN, M.R.; WERNER, J.H. Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. **Experimental Biology and Medicine**, v. 85, n. 1, p. 183-188, 1954.

HOFFMAN, J.A.; SHAH, A.J.; ROSS, L.A.; KAPOOR, N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, p. 388–394, 2001.

HONG, J.; LEE, H.; PIEDRA, P.A.; CHOI, E.; PARK, K.; KOH, Y.; KIM, W. Lower Respiratory Tract Infections due to Adenovirus in Hospitalized Korean Children: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1423-1429, 2001.

HONG, S.S.; HABIB, N.A.; FRANQUEVILLE, L.; JENSEN, S.; BOULANGER, P.A. Identification of adenovirus (Ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative Ad (Add1520) for treatment of liver tumors. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10366–10375, 2003.

HOWARD, D.; PHILLIPS, G.; REECE, D.; MUNN, R.K.; HENSLEE—DOWNEY, J.; PITTARD, M.; BARKER, M.; POMEROY, C. Adenovirus infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1494-1501, 1999.

HORWITZ, M.S. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. Review. **Virology**, v. 5, p. 1-8, 2001.

HUQ, F.; RAHMAN, M.; NAHAR, N.; ALAM, A.; HAQUE, M.; SACK, D.A.; BUTLER, T.; HAIDER, R. Acute lower respiratory tract infection due to virus among hospitalized children in Dhaka, Bangladesh. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, 1990, S982 -S987 (suppl 8).

IBIAPINA, C.C.; ALVIM, C.G.; ROCHA, F.G.; COSTA, G.A.; SILVA, P.C.A. Pneumonias Comunitárias na Infância: Etiologia, Diagnóstico e Tratamento. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, 2004, (Supl. 1), S19 - S25.

JAAKKOLA, J.J.; AHMED, P.; IEROMNIMON, A.; GOEPFERT, P.; LAIOU, E.; QUANSAH, R.; JAAKKOLA, M.S. Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 823–830, 2006.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. RJ: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, Edição 24<sup>th</sup>, p. 419 - 426, 2009.

KAJON, A.; WADELL, G. Genome Analysis of South American Adenovirus Strains of Serotype 7 Collected over a 7-Year Period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2321 – 2323, 1994.

KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K., MIYATA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 3059 – 3066, 2002.

KATZE, M.G.; DeCORATO, D.; SAFEFR, B.; GALABRU, J.; HOVANESSIAN, A.G. Adenovirus VAI RNA complexes with the 68 000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 3, p. 689 – 697, 1987.

KEHL, S.C.; HENRICKSON, K.J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 1696–1701, 2001.

KIDD, A.H.; GRAWICZ, D.; OBERG, M. Human and simian adenoviruses: phylogenetic inferences from analysis of VA RNA genes. **Virology**, v. 207, p. 32-45, 1995.

KIDD, A H.; JÖNSSON, M.; GARWICZ, D.; KAJON, A.E.; WERMENBOL, A.G.; J C de JONG, J.C. Rapid Subgenus Identification of Human Adenovirus Isolates by a General PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n 3, p. 622 – 627, 1996.

KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, p. 2286 – 2287, 2001.

KO, G.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D. Detection of Infectious Adenovirus in Cell Culture by mRNA ReverseTranscription-PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 39, p. 7377–7384, 2003.

KOJAOGHLANIAN, T.; FLOMENBERG, P.; HORWITZ, M.S. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. **Reviews in Medical Virology**, v. 13, p. 155 – 171, 2003.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; FERRENBORG, J.; MEEI-LI, H.; CENT, A.; COREY, L.; MORROW, R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2382 – 2388, 2006.

LARRAÑAGA, C.; AVENDAÑO, L.; GAGGERO, A.; SÚAREZ, M.; MONTALDO, G.; PALOMINO, M.A.; *et al.* Diagnóstico de infección por adenovirus y virus respiratorio sincicial en lactantes: comparación entre aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. **Revista Chilena de Infectología**, v. 7, n. 3, p. 167–171, 1990.

LARRAÑAGA, C.; KAJON, A.; VILLAGRA, E.; AVENDAÑO, L.F. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile: 1988-1996. **Journal of Medical Virology**, v. 60, p. 342 – 346, 2000.

LEITE, J.P.G. Adenoviridae. In: OLIVEIRA, L.H.S. *Virologia Humana*. RJ: Editora Cultura Médica, p. 232, 1994.

LI, L.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; KIM, K.S.; SEO, J.K.; SHIMIZU, H.; SUZUKI, E.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among

Pediatric Population with Diarrhea in Asia. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 2, p. 121-128, 2005.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação**. 7ª Edição, Guanabara Koogan, RJ – p. 17-1 a 17-2, 1992.

LÓPEZ-CAMPOS, G.; COIRAS, M.; SÁNCHEZ-MERINO, J.P.; LÓPEZ-HUERTAS, M.R.; SPITERI, I.; MARTÍN-SÁNCHEZ, F.; PÉREZ-BREÑA, P. Oligonucleotide microarray design for detection and serotyping of human respiratory adenoviruses by using a virtual amplicon retrieval software. **Journal of Virology Methods**, v. 145, n. 2, p. 127-136, 2007.

LÓPEZ, H.M.; MARTÍNEZ, I.L. Adenovirus aislados de pacientes mexicanos con infección respiratoria aguda. **Revista Biomédica**, v. 18, p. 146-152, 2007.

LUO, A.; QIAO, H.; ZHANG, Y.; SHI, W.; HO, S.Y.W.; XU, W.; ZHANG, A.; ZHU, C. 2010. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. **BMC Evolutionary Biology**, v. 242, p. 1-13, 2010.

MA, Y.; MATHEWS, M.B. Secondary and tertiary structure in the central domain of adenovirus type 2 VA RNA. **RNA**, v. 2, p. 937-955, 1996.

MACEDO, S.E.C.; MENEZES, A.M.B.; ALBERNAZ, E.; POST, P.; KNORST, M. Fatores de risco para internação por doença respiratória aguda em crianças até um ano de idade. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 351 – 358, 2007.

MADELEY, C.R.; PEIRIS, J.S. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, n. 2, p. 121 – 134, 2002.

MADISCH, I.; HARSTE, G.; POMMER, H.; HEIM, A. Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. **Journal of Virology**, v. 79, p. 15265 – 15276, 2005.

MAHONY, J.B.; BLACKHOUSE, G.; BABWAB, J.; SMIEJA, M.; BURACOND, S.; CHONG, S.; COCCOTELLI, W.; O'SHEA, T.; ALNAKHLI, D.; TURNER, M.G.; GOEREE, R. Cost Analysis of Multiplex PCR Testing for Diagnosing Respiratory Virus Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2812 –2817, 2009.

MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. **Desk Encyclopedia of General Virology**. Oxford, Jordan Hill Publishing, p. 90-92, 2010.

MAJHEN, D.; AMBRIOVIC-RISTOV, A. Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy? **Virus Research**, v. 119, p. 121-133, 2006.

MANDELBOIM, M.; DROR, P.; AZAR, R.; BROMBERG, M.; MENDELSON, E. Adenovirus Infections in Hospitalized Patients in Israel: Epidemiology and Molecular Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 597 – 601, 2011.

MARTTILA, M.; PERSSON, D.; GUSTAFSSON, D.; LISZEWSKI, M.K.; ATKINSON, J.P.; WADELL, G.; ARNBERG, N. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. **Journal of Virology**, v. 79, p. 14429–14436, 2005.

MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo: Editora Holos; 2001.

METSÄLÄ, J.; KILKKINEN, A.; KAILA, M.; TAPANAINEN, H.; KLAUKKA, T.; GISSLER, M.; VIRTANEN, S.M. Perinatal Factors and the Risk of Asthma in Childhood - A Population-based Register Study in Finland. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, p. 170–178, 2008.

MISTCHENKO, A.S.; DIEZ, R.A.; MARIANI, A.L.; ROBALDO, J.; MAFFEY, A.F.; BAYLEY-BUSTAMANTE, G.; GRINSTEIN, S. Cytokines in adenoviral disease in children: Association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. **Journal of Pediatrics**, v. 124, p. 714 – 720, 1994.

MYIAO, C.R.; GILIO, A.E.; VIEIRA, S. et al. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de Pediatria**, v. 75, p. 334-344, 1999.

MORAIS, M.T.; LEITE, J.P.; SIQUEIRA, M.M.; PORTES, S.A.; KRAWCZUK, M.M.; NASCIMENTO, J.P. Genomic characterization of adenovirus serotype 7 isolated in Brazil from acute respiratory disease patients during the period from 1980 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 4, p. 185–189, 1997.

MOURA, F.E.A.; BORGES, L.C.; SOUZA, L.S.F.; RIBEIRO, D.H.; SIQUEIRA, M.M.; RAMOS, E.A.G. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 275-282, 2003.

MOURA, P.O.; HEIN, N.; BALDACCI, E.; VIEIRA, S.E.; EJZENBERG, B.; PERRINI, P.; STEWIEN, K.E.; DURIGON, E.L.; MEHNERT, D.U.; HARSI, C.M. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 174-181, 2007.

MURDOCH, D.R.; ANDERSON, T.P.; BEYNON, K.A.; *et al.* Evaluation of a PCR assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and non-respiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 63 – 66, 2003.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Microbiologia Médica. Editora Mosby, 2006. Tradução da 5ª edição por CASTILLO, S.M. Escuela de la Medicina – Universidad de Carolina del sur. Instituto Politécnico Nacional, México. pela Microbiologia e Imunologia on-line. VIROLOGÍA – CAPÍTULO DIECISÉIS: Virus de la Parainfluenza, Sincicial Respiratorio y Adenovirus. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter16.htm> - Acesso em 07 de Setembro de 2011.

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment. A microbiological update. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 273 – 278, 2007.

NASCIMENTO, J.P.; SIQUEIRA, M.M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M.M.; FARIAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M.J. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro, occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 287 – 296, 1991.

NEMEROW, G.R.; PACHE, L.; REDDY, V.; STEWART, P.L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v. 384, p. 380–388, 2009.

New England *BioLabs* : <http://www.neb.com/nebecomm/EnzymeFinder.asp> - : Visita em 12 de Setembro de 2009.

NEWTON, M.A.; RAFTERY, A.E. Approximate Bayesian inference by the weighted likelihood bootstrap (with Discussion). **Journal of the Royal Statistical Society series B**, v. 56, p. 3-48, 1994.

NOLTE, F.; MARSHALL, D.; RASBERRY, C.; SCHIEVELBEIN, S.; BANKS, G.; STORCH, G.A.; ARENS, M.Q.; BULLER, R.S.; PRUDENT, J.R. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2779 – 2786, 2007.

OGAWA, E.; ELLIOTT, W.M.; HUGHES, F.; EICHHOLTZ, T.J.; HOGG, J.C.; HAYASHI, S. Latent adenovirus infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, p. 189–197, 2004.

PACHE, L.; VENKATARAMAN, S.; REDDY, V.S.; NEMEROW, G.R. Structural Variations in Species B Adenovirus Fibers Impact CD46 Association. **Journal of Virology**, v. 82, p. 7923–7931, 2008.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G.; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 839 – 845, 2007.

PANDEY, M.R.; BOLEIJ, J.S.; SMITH, K.R.; WAFULA, E.M. Indoor air pollution in developing countries and acute respiratory infection in children. **Lancet**, v. 1, p. 427 – 429, 1989.

PATZKE, C.; MAX, K.E.A.; BEHLKE, J.; SCHREIBER, J.; SCHMIDT, H.; DORNER, A.A.; KRÖGER, S.; HENNING, M.; OTTO, A.; HEINEMANN, U.; RATHJEN, F.G. The Coxsackievirus–Adenovirus Receptor Reveals Complex Homophilic and Heterophilic Interactions on Neural Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 2897 – 2910, 2010.

PHAM, T.T.; BURCHETTE, J.L.; HALE, L.P. Fatal disseminated adenovirus infection in immunocompromised patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, p. 575 -583, 2003.

PIEDRA, P.A. Adenovirus in the neonatal intensive care unit: formidable, forgotten foe. **Journal of Pediatrics**, v. 146, p. 447 – 448, 2005.

POST, C.L.A.; VICTORA, C.G.; VALENTE, J.G.; LEAL, M.C.; NIOBEY, F.M.L.; SABROZA, P.C. Fatores prognósticos de letalidade hospitalar por diarréia ou pneumonia em menores de um ano de idade. Estudo de caso e controle. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 369-378, 1992

PRIETSCH, S.O.; FISCHER, G.B.; CESAR, J.A.; FABRIS, A.R.; MEHANNA, H.; FERREIRA, T.H.; SCHEIFER, L.A. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. **Jornal de Pediatria** (Rio J), v. 78, n. 5, p. 415 – 422, 2002.

PRINCE, G.A.; PORTER, D.D.; JENSON, A.B.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R.M.; GINSBERG, H.S. Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). **Virology**, v. 67, n. 1, p. 101-111, 1993.

PUJOL, B.S.; VABRET, A.; LEGRAND, L.; DINA, J.; GOUARIN, S.; LECHERBONNIER, J.P.; POZZETTO, B.; GINEVRA, C.; FREYMUTH, F. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory viruses. **Journal of Virology Methods**, v. 126, p. 53–63, 2005.

RABONI, S.M.; NOGUEIRA, M.B.; TSUCHIYA, L.R.V.; TAKAHASHI, G.A.; PEREIRA, L.A.; PASQUINI, R.; SIQUEIRA, M.M. Respiratory Tract Viral Infections in Bone Marrow Transplant Patients. **Transplantation**, v. 76, p. 142 – 146, 2003.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A.J. **Tracer: MCMC analysis tool**. Version 1.5. 2009. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.

RIEGER-FACKELDEY, E.; AUMEIER, S.; GENZEL-BOROVICZÉNY, O. Disseminated Adenovirus Infection in Two Premature Infants. **Infection**, v. 28, p. 237-239, 2000.

ROBINSON, C.M.; SINGH, G.; HENQUELL, C.; WALSH, M.P.; PEIGUE-LAFEUILLE, H.; SETOS, D.; JONES, M.S.; DYER, D.W.; CHODOSH, J. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. **Virology**, v. 409, p. 141–147, 2011.

ROCHOLL, C.; GERBER, K.; DALY, J.; PAVIA, A.T.; BYINGTON, C.L. Adenoviral Infections in Children: The Impact of Rapid Diagnosis. **Pediatrics**, v. 113, p. 51-56, 2004.

RODRIGUES, J.C.; SILVA, L.V.F.; BUSH, A. Diagnóstico etiológico das pneumonias-uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 129 – 140, 2002.

ROELVINK, P.W.; LIZONOVA, A.; LEE, J.G.; LI, Y.; BERGELSON, J.M.; FINBERG, R.W.; BROUGH, D.E.; KOVESDI, I.; WICKHAM, T.J. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. **Journal of Virology**, v.72, p. 7909-7915, 1998.

ROINGEARD, P. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. **Biology of the Cell**, v. 100, p. 491 – 501, 2008.

ROMERO, O.B. Apresentação em PowerPoint. Título: **Biologia Molecular no Diagnóstico de Infecções Virais**. Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.hc.ufmg.br/ccih/simposio/>> Acesso em: 04 de setembro de 2009.

ROWE, W.P.; HUEBNER, R.J.; GILMORE, L.K. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 84, p. 570-573, 1953.

RUSSELL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function – Review. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1-20, 2009.

RUUSKANEN, O.; MEURMAN, O.; SARKKINEN, H. Adenoviral Diseases in Children: A Study of 105 Hospital Cases. **Pediatrics**, v. 76, p. 79 – 83, 1985.

RUX, J.J.; KUSER, P.R.; BURNETT, R.M. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution X-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. **Journal of Virology**, v. 77, p. 9553 – 9566, 2003.

SABAN, S.D.; SILVESTRY, M.; NEMEROW, G.R.; STEWART, P.L. Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. **Journal of Virology**, v. 80, p. 12049 – 12059, 2006.

SAITOH-INAGAWA, W.; OSHIMA, A.; AOKI, K.; ITOH, N.; ISOBE, K.; UCHIO, E.; OHNO, S.; NAKAJIMA, H.; HATA, K.; ISHIKO, H. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2113 – 2116, 1996.

SALUD. Capítulo IV – **Lineamientos para La toma, manejo y envío de muestras de laboratorio durante La fase pandêmica**. Versión: AGOSTO, 2006.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. Segunda Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 160 – 169, 2008.

SCHMITZ, H.; WIGAND, R.; HEINRICH, W. Worldwide epidemiology of human Adenovirus infections. **American Journal of Epidemiology**, v. 117, p. 455 – 466, 1983.

SEADI, C.F.; ORAVEC, R.; POSER, B.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infection: Advantages and disadvantages of the tests. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 125 – 133, 2002.

Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo – Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE/SP). Disponível em: [www.cve.saude.sp.gov.br/htm/nive/SRAG\\_2004NT.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/nive/SRAG_2004NT.htm). Acessada em 28 de Agosto de 2009.

SEGERMAN, A.; ATKINSON, J.P.; MARTTILA, M.; DENNERQUIST, V.; WADELL, G.; ARNBERG, N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. **Journal of Virology**, v. 77, p. 9183 – 9191, 2003.

SETO, J.; WALSH, M.P.; MAHADEVAN, P.; PURKAYASTHA, A.; CLARK, J.M.; TIBBETTS, C.; SETO, D. Genomic and bioinformatics analyses of HAdV-14p, reference strain of a re-emerging respiratory pathogen and analysis of B1/B2. **Virus Research**, v. 143, p. 94 – 105, 2009.

SHENK, T.E. Adenoviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), **Fields Virology**, 4th ed. Lippincott/TheWilliams &Wilkins Co., Philadelphia, PA, p. 2265 – 2300, 2001.

SHIN, Y.J.; CHO, K.O.; CHO, H.S. *et al.* Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v.82, p.83-86, 2004.

SHORT, J.J.; VASU, C.; HOLTERMAN, M.J.; CURIEL, D.T.; PEREBOEV, A. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. **Virus Research**, v. 122, p. 144 – 153, 2006.

SHULT, P.A.; POLYAK, F.; DICK, E.C.; WARSHAUER, D.M.; KING, L.A.; MANDEL, A.D. Adenovirus 21 infection in an isolated antarctic station: transmission of the virus and susceptibility of the population. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, p. 599–607, 1991.

SIRENA, D., LILIENFELD, B.; EISENHUT, M.; KALIN, S.; BOUCKE, K.; BEERLI, R.R.; VOGT, L.; RUEDL, C.; BACHMANN, M.F.; GREBER, U.F.; HEMMI, S. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. **Journal of Virology**, v. 78, p. 4454 – 4462, 2004.

SPENCER, M.J.; CHERRY, J.D. Adenoviral Infections. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. **Textbook of pediatric infectious diseases**. Ed 2, p. 1688 – 1708, 1987.

STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, V.J. **Basic and Clinical Immunology**, 6<sup>th</sup> Edition, Appleton & Lange, p. 241 – 284, 1987.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MACHADO, V.; MAIA, T.M.R. Respiratory Viruses in the Pediatric Intensive Care Unit: Prevalence and Clinical Aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 883 – 887, 2004.

SUARA, R.O.; GLEZEN, W.P. Contribution of Respiratory Viruses to the Worldwide Problem of Pneumonia in Young Children. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 6, p. 121 – 127, 1995.

SUCHARD, M., R.E. WEISS, J.S. SINSHEIMER. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1001 – 1013, 2001.

SUKUMARAN, J. AND MARK T. HOLDER. DendroPy: A Python library for phylogenetic computing. **Bioinformatics**, v. 26, p. 1569 – 1571, 2010.

SUOMALAINEN, M.; NAKANO, M.Y.; KELLER, S.; BOUCKE, K.; STIDWILL, R.P.; GREBER, U.F. Microtubule-dependent plus-and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. **Journal of Cell Biology**, v. 144, p. 657 – 672, 1999.

SUOMALAINEN, M.; NAKANO, M.Y.; BOUCKE, K.; KELLER, S.; GREBER, U.F. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule mediated nuclear targeting of virus. **EMBO Journal**, v. 20, n. 6, p. 1310–1319, 2001.

SYRMIS, M.W.; WHILEY, D.M.; THOMAS, M.; MACKAY, I.M.; WILLIAMSON, J.; SIEBERT, D.J.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 6, p. 125 –131, 2004.

TALBOT, H.K.; FALSEY, A.R. The Diagnosis of Viral Respiratory Disease in Older Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 5, p. 747 – 751, 2010.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

TARJA, H.K.; KORPI, M.; JOKINEN, C.; KURKI, S.; HEISKANEN, L. Etiology of childhood pneumonia: serologic result of a prospective, population-based study. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 17, p. 986 – 991, 1998.

TEMPLETON, K.E.; SCHELTINGA, S.A.; van den EEDEN, W.C.J.F.M.; GRAFFELMAN, A.W.; van den BROEK, P.J.; CLAAS, E.C.J. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 345 – 351, 2005.

TEPER, A.; FISCHER, G.B.; JONES, M.H. Sequelas respiratórias de doenças virais: do diagnóstico ao tratamento – Artigo de Revisão. **Jornal de Pediatria**, v. 78, 2002, (Supl.2): S187 – S194.

TIEMESSEN, C.T.; KIDD, A.H. The subgroup F Adenoviruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 481 – 487, 1995.

TORTORA, J.D.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 381, 2005.

TRENTIN, J.J.; YABE, Y.; TAYLOR, G. The quest for human cancer viruses. **Science**, v. 137, p. 835 – 841, 1962.

TSUCHIYA, L.R.R.V.; COSTA, L.M.D.; RABONI, S.M.; NOGUEIRA, M.B.; PEREIRA, L.A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G.R.A.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M.M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **Journal of infection**, v. 5, p. 401 – 407, 2005.

TUVE, S.; WANG, H.; WARE, C.; LIU, Y.; GAGGAR, A.; Kathrin BERNT, K.; SHAYAKHMETOV, D.; LI, Z.Y.; STRAUSS, R.; STONE, D.; LIEBER, A. A New Group B Adenovirus Receptor Is Expressed at High Levels on Human Stem and Tumor Cells. **Journal of Virology**, v. 80, p. 12109 – 12120, 2006.

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; JOAZEIRO, P.P.; WEIGL, D.R. Rapid virus diagnosis by electron microscopy. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 55, n. 2, p. 57 – 65, 1995.

VALERO, N.; LARREAL, Y.; AROCHA, F.; *et al.* Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. **Investigación Clínica**, v. 50, n.3, p. 359 – 368, 2009.

VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; MISIRLIAN, A.; AGUILAR, M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 10, p. 17-23, 1998.

VIEIRA, S.E.; STEWIEN, K.E.; QUEIROZ, D.A.O.; DURIGON, E.L.; TÖRÖK, T.J.; ANDERSON, L.J.; MIYAO, C.R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V.F.; PAHL, M.M.; GILIO, A.E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125 – 131, 2001.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematic: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, p. 29 – 54, 2005.

WADELL G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 110, p. 191-220, 1984.

WADELL, G. *Adenoviridae: The adenoviruses*. P. 284-300. Lennette E.H.; Halonen P.; Murphy F.A. (ed). **Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice**, Vol II. Viral, rickettsial, and chlamydial diseases. Springer-Verlag, Nova Iorque, 1988.

WALSH, M.P.; SETO, J.; JONES, M.S.; CHODOSH, J.; XU, W.; SETO, D. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 991 – 993, 2010.

WEINBERG, G.A.; ERDMAN, D.D.; EDWARDS, K.M.; WALKER, C.B.; HALL, F.J.; GRIFFIN, M.R.; SCHWARTZ, B., and the New Vaccine Surveillance Network Study Group. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 706 – 710, 2004.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Adenoviridae**. In: WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, p. 306 – 315, 1994.

WICKHAM, T.J.; MATHIAS, P.; CHERESH, D.A.; NEMEROW, G.R.. Integrins  $\alpha\text{v}\beta 3$  and  $\alpha\text{v}\beta 5$  promote Adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v. 73, p. 309 – 319, 1993.

WIETHOFF, C.M.; WODRICH, H.; GERACE, L.; NEMEROW, G.R. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. **Journal of Virology**, v. 79, p. 1992 – 2000, 2005.

WIGAND, R.; ADRIAN, T.H. **Classification and epidemiology of adenoviruses**. In: DOERFLER, W. Adenovirus DNA. Boston, Martins Nujhoff Publishing, p. 409 – 436, 1986.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3741 – 3751, 1997.

WISE, D.J.; CARTER, G.R.; FLORES, E.F. In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Last updated: 3-Mar-2005; A3407.0305.PT. **Diagnóstico laboratorial de infecções víricas**. Traduzido por: FLORES, E.F. Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (14-Dec-2005).

WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K.N.; TREADWAY, J.A.; LARSON, J.P.; GE, N.; *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker HeP-2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 41 – 46, 2002.

YEUNG, R.; ESHAGHI, A.; LOMBOS, E.; BLAIR, J.; MAZZULLI, T.; BURTON, L.; DREWS, S.J. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007 – June 2008. **Virology**, v.6, p. 11, 2009.

YUAN, W.; BASSO, O.; SORENSEN, H.T.; OLSEN, J. Fetal growth and hospitalization with asthma during early childhood: a follow-up study in Denmark. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, p. 1240 – 1245, 2002.

ZHANG, Y.; BERGELSON, J.M. Adenovirus receptors. **Journal of Virology**, v. 79, p. 12125 –12131, 2005.

ZHAO, H.; GRANBERG, F.; PETTERSSON, U. How adenovirus strives to control cellular gene expression. **Virology**, v. 363, p. 357 – 375, 2007.

ZHU, Z.; ZHANG, Y.; XU, S.; YU, P., TIAN, X.; WANG, L.; LIU, Z.; TANG, L.; MAO, N.; JI, Y.; LI, C.; YANG, Z.; WANG, S.; WANG, J.; LI, D.; XU, W. Outbreak of acute respiratory disease in China caused by B2 species of adenovirus type 11. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 697–703, 2009.



**Unidade de internamento:**

UTI  berçário  emergência  clínica pediátrica  outra: \_\_\_\_\_

**Antibioticoterapia:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_ Princ. Ativo: \_\_\_\_\_

**Broncodilatador:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_ Princ. Ativo: \_\_\_\_\_

**Corticóide:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_ Princ. Ativo: \_\_\_\_\_

**Inalação:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_

**Oxigenioterapia:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_

**Respiração assistida:**  sim  não tempo: \_\_\_\_\_

**Rx de tórax:** \_\_\_\_\_

**TAC tórax:** \_\_\_\_\_

**Evolução:**  cura  óbito

**Complicações:** \_\_\_\_\_

## APÊNDICE II

**FORMULÁRIO DE COLETA - DADOS LABORATORIAIS (1/1)**  
**PACIENTES PEDIÁTRICOS**

**I – IDENTIFICAÇÃO:**

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Número da amostra: \_\_\_\_\_

**HEMOGRAMA**

Hemoglobina

Hematócrito

Hemoglobina corpuscular média

Conc. de hemoglobina corpuscular média

Volume corpuscular médio

Contagem de plaquetas

Contagem leucocitária total e diferencial

**GASOMETRIA ARTERIAL**

pH

pCO<sub>2</sub>pO<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>

BE

SatO<sub>2</sub>**Testes diagnósticos para o HIV realizados:**

\_\_\_\_\_

**7. Período total de acompanhamento** da criança até a definição da situação de infecção pelo HIV:\_\_\_\_\_ Semanas  Meses **HEMOCULTURA** Realizada  Não realizada  - Bactéria encontrada: \_\_\_\_\_**CULTURA DE SECREÇÃO DE OROFARINGE** Realizada  Não realizada  -

Bactéria encontrada: \_\_\_\_\_

**CULTURA CELULAR** Positiva  Negativa Se positiva realizar Imunofluorescência para determinar tipo de Agente da IRA: \_\_\_\_\_**IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA HAdV** Positiva  Negativa **PCR** Positiva  Negativa **Subgênero** B:1  B:2  C  D

### APÊNDICE III

#### **Preparo do Tampão de Tiocianato de Guanidina (GUSCN):**

- Tiocianato de Guanidina 3 M,
- Sarcosyl 3%,
- Dietil Treitol (DTT) 1 M,
- Citrato de Sódio 1 M,
- Glicogênio,
- Após preparo embrulhar o tubo cônico em papel alumínio e guardar em geladeira.

#### **Extração das amostras de Aspirado de Nasofaringe (ANF)**

A extração do ácido nucleico viral foi realizada como segue, método GUSCN:

- Retirar amostras do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e vortexá-las,
- Em eppendorf adicionar 200  $\mu\text{L}$  da amostra e 200  $\mu\text{L}$  do Tampão GUSCN,
- Deixar por 10 minutos a Temperatura ambiente (TA),
- Acrescer 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol frio,
- Vortexar e após centrifugar, os tubos, por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , a 14.000 rpm,
- Descartar todo o sobrenadante com pipeta,
- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frio,
- Agitar por inversão, tentando fazer com que o pellet desprenda das paredes dos tubos,
- Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Desprezar o sobrenadante e deixar os tubos abertos, incubando por 10 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ .
- Uma vez seco, adicionar 22,5  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases,
- Vortexar suavemente e armazenar o DNA extraído a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser realizada a amplificação.

## APÊNDICE IV

PROTOCOLO HADV – *Nested* PCR (Avellón *et al*, 2001)

N	AMOSTRA DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	

DNA extraído em \_\_\_\_\_

Método \_\_\_\_\_

Técnico \_\_\_\_\_

PCR realizado em - \_\_\_\_\_ Técnico - \_\_\_\_\_

Reagente	Usar 2,5 µL do DNA	Usar 1 µL do PCR1
H <sub>2</sub> O	13 µL x	14.5 µL x
10x Buffer	2.5 µL x	2.5 µL x
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 µL x	0.75 µL x
1,25 dntp's	4 µL x	4 µL x
ADHEX <b>1F</b> 10pmol/µl	1 µL x	ADHEX <b>2F</b> 1 µL x 10 pmol/µl
ADHEX <b>2R</b> 10pmol/µl	1 µL x	ADHEX <b>1R</b> 1 µL x 10 pmol/µL
TAQ polimerase	0,25 µL x	0,25 µL x
Volume final	25 UI	25 UI
	1 x 94°C – 2' 30 x 94°C – 1' 50°C – 1' 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 6' 4°C - ∞	1 x 94°C – 2' 30 x 94°C – 1' 50°C – 1' 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 6' 4°C - ∞

- Analisar em gel de agarose a 1%+ Brometo de Etidium
- Aplicar no gel: 2 µL amostra + 7 µL H<sub>2</sub>O + 1 µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 Kb Plus 10 µL (pronto para uso), Corrida 100V, por 75'
- Produto esperado: 168 pb

## APÊNDICE V

### PROTOCOLO DO MATERIAL UTILIZADO PARA CULTURA CELULAR

#### Isolamento em culturas celulares

NUTRIENTES DAS CÉLULAS EM CULTURA (DMEM) – Meio mínimo essencial de Dulbecco - Normalmente o meio DMEM é utilizado para células aderentes.

#### FUNGIZON

Antifúngico - evita o crescimento de fungos.

#### PENICILINA/ ESTREPTOMICINA

Antibióticos utilizados para evitar o crescimento de bactérias contaminantes.

#### TRIPSINA 0,25 %

Soltar as células que estão aderidas à parede dos tubos e das garrafas.

#### SORO BOVINO FETAL:

- Fundamental na estabilização e manutenção de cultivos celulares.
- o meio celular requer suplemento com hormônios e outros fatores de crescimento que podem estar envolvidos em:
  - transporte de nutrientes;
  - manutenção do balanço de energia celular;
- controle de síntese de macromoléculas e fatores que estimulam a formação de produtos (FRESHNEY, 2005).

#### COMPONENTES DO SORO E SUA PROVÁVEL FUNÇÃO:

O soro contém fatores de crescimento para proliferação celular, fatores de adesão e atividade anti-tripsina. O soro contém também minerais, lipídios e proteínas (Quadro 8).

QUADRO 8 – COMPONENTES DO SORO BOVINO FETAL E SUAS PROVÁVEIS FUNÇÕES

COMPONENTES	PROVÁVEL FUNÇÃO
Proteínas	Transportador de minerais, hormônios, lipídeos e atua tb como tampão. Aderência celular Inibidor da tripsina União com o ferro
Albumina	
Fibronectina	
Alfa 2 macroglobulina	
Transferrina	
Polipeptídeos	Mitógeno
Fator de crescimento endotelial	
Fator de crescimento epidérmico	
Fator de crescimento de fibroblastos	Mitógeno
Hormônios	Promove a aderência e a proliferação
Hidrocortisona	
Insulina	
Hormônio de crescimento	Promove a utilização de glicose e aminoac.
Metabólitos e nutrientes	Mitógeno presente em soro fetal
Aminoácidos	Proliferação celular
Glicose	
Lipídios	Síntese de membrana
Minerais	Co-fatores enzimáticos
Ferro, Cobre, Zinco, Selênio	

FONTE: FRESHNEY, 2005

d.3.1) PRINCÍPIO:

Consiste no descongelamento, manutenção e amplificação de linhagens celulares e inoculação da amostra em linhagens celulares susceptíveis aos vírus em pesquisa, e na identificação do isolado viral e na análise do efeito citopático.

d.3.2) LIMITES DE DETECÇÃO:

Não consta.

d.3.3) MODELO DE RESULTADO:

Não consta.

d.3.4) INTERFERENTES DO TESTE:

Presença de Bactérias ou Fungos na amostra ou reagentes.

d.3.5) AMOSTRA:

Linhagem de Células HEp-2

d.3.6) REAGENTES E MATERIAIS

Meio Mínimo Essencial

Soro Bovino Fetal

Água Destilada

Pipetas de vidro graduadas

Gaze estéril

Algodão

Álcool

Acetona

Pipetas Pasteur

d.3.7) EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA A TÉCNICA:

Estufa Bacteriológica

Freezer

Máscaras e luvas estéreis

Bomba à vácuo

Banho-maria

Vidrarias em geral

Garrafas de cultivo celular

Filtros com poros de 0,22  $\mu\text{m}$

Pipetador automático

Microscópio Invertido

Câmara de Fluxo Laminar

Lâmpadas de UV

Bico de Bunsen

Geladeira para armazenamento dos reagentes

#### d.3.8) PROCEDIMENTO DETALHADO:

##### d.3.8.1) Preparo de padrões:

Todos os reagentes utilizados devem ser esterilizados por autoclavação por filtração. Sendo necessário manter controle de esterilidade, incubando estes em meio bacteriológico enriquecido de tioglicolato (Meio para a realização dos ensaios de esterilidade).

##### d.3.8.2) Preparo da Célula:

###### d.3.8.2.1) Descongelamento de linhagens celulares:

Retirar a ampola do “container” com nitrogênio líquido e transferi-la imediatamente para o banho-maria a 37°C.

Agitar a ampola para acelerar o descongelamento. Quando a suspensão de células estiver quase totalmente descongelada, levar para a câmara de fluxo laminar.

Com uma pipeta retirar o conteúdo da ampola e colocá-lo em meio de cultura com 10% de SBF (MEM q.s.p. 7 mL = vol. final para garrafa pequena)

Transferir para garrafa de cultura pequena e homogeneizar cuidadosamente

Incubar a 37° C

Trocar o meio quando estiver ácido ou 24 horas após o descongelamento.

###### d.3.8.2.2) Manutenção das linhagens HEp-2

- “split” 1:2 para garrafas com +++:

Desprezar o meio contido na garrafa

Lavar a garrafa com 5 ml de PBS.

Colocar Tripsina + EDTA 0,25%: 3 mL para garrafa pequena

8mL para garrafa média

Deixar a garrafa em repouso na posição horizontal por 2 ou 3 minutos

Observar em microscópio invertido o início do desprendimento celular

Desprezar quase totalmente a Tripsina 0,25%

Agitar a garrafa para completar o desprendimento das células

Suspender as células em meio de cultura com 10% de SBF, homogeneizar com pipeta para evitar a formação de grumos.

Transferir para a nova garrafa de cultura, cuidando para que seja colocado o mesmo volume da suspensão em cada garrafa.

Completar com meio de crescimento respeitando o volume ideal para cada garrafa

Anotar a data e o número da passagem na garrafa e incubar a temperatura de 37°C.

Volume da suspensão em cada garrafa:

Garrafa Pequena	Garrafa Média	Garrafa Grande
7 mL	12 mL	24 mL

OBS: Todos os reagentes na temperatura de 37°C.

Repique para tubos e garrafas, preparar primeiro as garrafas.

d.3.8.2.3) Troca de meio de cultura:

Desprezar o meio contido na garrafa

Colocar o meio novo com 10% de SBF a temperatura de 37°C.

OBS: Trocar o meio quando estiver ácido ou 48 horas após o repique.

d.3.9) Congelamento de células:

Preparar o meio de congelamento: 10% SBF + 10% DMSO + 80% MEM

O volume de meio deve ser adequado ao número de ampolas que serão congeladas.

ex.: garrafa média (75 cm<sup>3</sup>) preparar aproximadamente 3 ampolas.

Deixar em cuba com gelo durante todo o período de manipulação das células.

CUIDADO: DMSO É ONCOGÊNICO - Criopreservante - impede a formação de cristais no interior das células após congelamento, estes poderiam destruí-la.

d.3.9.1) Técnica:

Tripsinizar a garrafa (+++ de crescimento) conforme a técnica, cuidando para não deixar resíduos de tripsina.

Ressuspender as células em 10 ml de MEM

Centrifugar 10 minutos a 1000 rpm

Desprezar o sobrenadante

Ressuspender o pellet em 1 mL de meio de congelamento

Transferir a ampola para freezer -80°C por 24 horas, posteriormente para N<sub>2</sub>.

d.3.10) Manutenção:

Usar MEM com 2% de SBF.

#### d.3.11) Inoculação das amostras:

Desprezar o meio de crescimento das culturas celulares.

Lavar o tapete celular, duas vezes, com Tripsina.

Após as células estarem soltas, colocá-las em meio MEM em 10% de Soro Bovino Fetal (SBF).

Inocular 1 ml da suspensão de células HEp-2 em tubos de cultura.

Deixar os tubos a 37°C/ 24 horas, para que as células possam aderir às paredes dos tubos.

Após as 24 horas, desprezar os meios de cultura dos tubos e inocular 200 µL das amostras em cada um dos tubos de cultura.

Levar os tubos de cultura contendo as amostras em estufa a 37°C/ 1 hora, para que possa ocorrer a adsorção do vírus à célula aderida ao tubo.

Então, acrescentar 1 mL de meio MEM a 2% de SBF (meio de manutenção; meio mínimo de Eagle com 2% de SBF) a cada tubo de cultura.

Observar as culturas celulares em microscópio, diariamente, até o surgimento do efeito citopático.

Se necessário, fazer repique.

#### d.3.12) Indicadores da necessidade de reposição do Meio de Cultura

- pH
- Concentração Celular
- Morfologia

##### pH

O pH geralmente diminui a medida que as células começam a metabolizar os substratos disponíveis.

A maneira mais comum de se verificar o pH da cultura é através da mudança de cor do meio de cultivo.

Geralmente os meios são vermelhos, passando para laranja e posteriormente amarelo, a medida que diminui o pH, indicando que há necessidade de adição de meio fresco.

### Concentração Celular

- Nas culturas com altas concentrações celulares a quantidade de nutrientes disponíveis está diminuída em comparação com aquelas mais diluídas;
- Ocorre exaustão do meio e redução do pH;
- A proliferação celular também diminui devido à escassez dos fatores de crescimento e outros substratos.

Pode ocorrer bloqueio das células na fase G1 do ciclo celular.

Para algumas células a manutenção do meio deve ser feita quase que diariamente.

### Morfologia Celular

- Alterações no substrato e na constituição do meio de cultura podem alterar a morfologia celular

Sinais de deterioração podem ser: granulose em volta do núcleo, formação de vacúolos citoplasmáticos e volume celular alterado. Isso indica necessidade de manutenção do meio.

### Impacto da temperatura:

- Os valores baixos de temperatura são menos perigosos que os valores altos.
- Valores de temperatura maiores que 40°C durante poucas horas pode levar a morte a população celular.

### Controle da concentração de Oxigênio:

- o O<sub>2</sub> deve estar em níveis suficientes para a produção de energia celular.
- uma queda nos níveis de O<sub>2</sub> pode levar a morte celular.
- altas concentrações pode levar a formação de radicais livres de alta toxicidade.

### Água: As células são muito sensíveis a qualidade da água.

- Compostos inorgânicos: metais pesados, ferro, cálcio.
- Compostos orgânicos.
- Contaminantes bacterianos: endotoxinas, pirógenos.

Há necessidade de destilação múltipla e/ou deionização.

## APÊNDICE VI

**PROTOCOLO PCR PARA HADV  
IDENTIFICAÇÃO DE SUBGÊNEROS**



**PROTOCOLO HADV SUBGÊNERO (Kidd *et al*, 1996)**

N	AMOSTRA DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	

Método \_\_\_\_\_

Tecnico \_\_\_\_\_

PCR realizado em - \_\_\_\_\_ Técnico - \_\_\_\_\_

Reagente	Usar 0,5 µL do DNA	
H <sub>2</sub> O	14,75 µL x	1 x 94°C – 1' 35 x 94°C – 1' 45°C – 1' 72°C – 3' 2 Hold 72°C – 8' 4°C - ∞
10x Buffer	2.5 µL x	
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 µL x	
1,25 dntp's	4 µL x	
Primer VA3a + VA3b 10pmol/µl	1 µL x	
Primer VA6 10pmol/µL	1 µL x	
TAQ polimerase	0,25 µL x	
Volume final	25 µL	

- Analisar em gel de agarose a 1%+ Brometo de Etidium
- Aplicar no gel: 2 µL amostra + 7 µL H<sub>2</sub>O + 1 µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 Kb Plus 10 µL (pronto para uso), Corrida 100V, por 75'
- Produto esperado: 240 a 290 pb (Subgênero A, B:2 e F) e 400 a 520 pb (Subgênero (B:1, C, D e E)







**APÊNDICE VIII (ARTIGO)**

## 8 ANEXOS

### ANEXO I

#### Procedimento de coleta do ANF:

- Colocar o paciente em decúbito dorsal, elevar a cabeça, insirir delicadamente uma alça contendo algodão estéril (raiom ou ponta Dacron), paralelo ao palato, atingindo a nasofaringe (2,5 cm a 3), girando. - Esfregar suavemente o cotonete na parede da nasofaringe e retirar enquanto gira. Isto é feito para ambas as narinas com cotonetes diferentes (Figura 21): Introduzir a ponta do swab no tubo de teste (contendo meio de transporte) o tubo deve ser fechado e mantido a 4°C. - Identificar o tubo de ensaio com fita adesiva. *Nota:* As amostras para isolamento viral devem ser refrigeradas imediatamente e inoculadas o mais rapidamente possível, em cultura de células. Não processar amostras de 48 - 72 horas. Evitar manter amostras de mais de 5 dias, em meios de transporte de refrigeração viral ou 24 horas em solução salina (*Salud*, 2006).

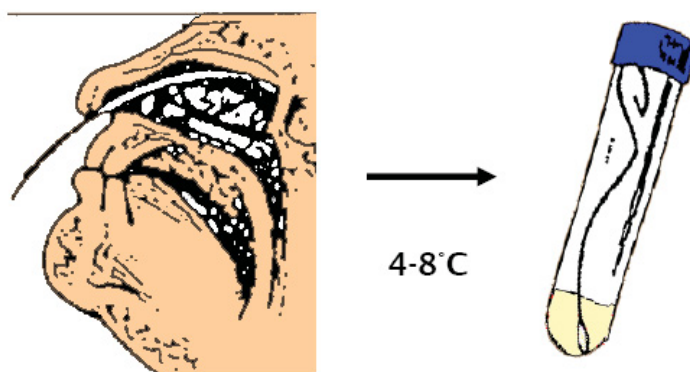


FIGURA 21 - Modelo de coleta/obtenção de aspirado de nasofaringe (ANF).  
FONTE: *Salud*, 2006.

Se, numa amostra clínica, a quantidade de vírus for pequena, o isolamento deste só será obtido quando o sistema mais sensível for utilizado. Portanto, é muito importante que o laboratório seja informado da síndrome clínica, ou do vírus suspeito, para que se possa utilizar o melhor método de detecção. Nenhuma técnica laboratorial (ou cultura celular), no entanto, será eficiente, se o espécime não for colhido, transportado, armazenado e processado de forma adequada.

Os espécimes precisam ser colhidos na fase aguda da infecção e a escolha da amostra deve ser apropriada. Portanto, àquelas, quando colhidas com "swab",

devem ser imediatamente colocadas em solução salina tamponada ou meio de cultura, para evitar o ressecamento e a consequente desnaturação dos vírus. De forma geral, todas as amostras devem ser transportadas imediatamente para o laboratório, em temperatura de geladeira e assim conservadas até o momento do diagnóstico, para evitar a inativação dos vírus pelo calor. Os espécimes deverão ser processados adequadamente antes da inoculação em culturas celulares ou em qualquer teste de diagnóstico. Esse processamento, de modo geral, inclui fases de eluição dos vírus da amostra, com uso de salina tamponada; clarificação por centrifugação, para eliminação de resíduos indesejáveis e descontaminação com agentes antibacterianos e/ou antifúngicos. Evita-se assim, que resíduos tóxicos ou microrganismos contaminantes interfiram no isolamento dos vírus e no diagnóstico.

## ANEXO II

### Protocolo para purificação do produto da PCR para sequenciamento

- Em gel de agarose 1% adicionar, em cada escavação, 15  $\mu$ L do produto da PCR e 1  $\mu$ L do Tampão de Amostra. Desenvolver a corrida a 100 V por 1 hora em tampão Tris-fosfato (pH = 7,5),
- Corar as bandas de DNA com brometo de etídio e visualizar o gel em luz UV. Utilizar estilete para recortar as bandas do gel e colocá-las em tubos de 1,5 mL,
- Adicionar aproximadamente 500  $\mu$ L de Gel Solution Buffer (GS1) e levar a 50°C por 15 minutos (para o gel dissolver e liberar o produto da PCR),
- Vortexar e colocar a mistura em tubo contendo filtro,
- Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto a 20°C (descartar o filtrado),
- Adicionar ao filtro 500  $\mu$ L de GS1,
- Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto a 20°C (descartar o filtrado),
- Acrescentar ao filtro 700  $\mu$ L de Wash Buffer (W9) e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente,
- Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto a 20°C (descartar o filtrado),
- Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto a 20°C, a seco, para remover o etanol,
- Transferir o filtro para outro tubo eppendorf e acrescentar ao mesmo 35  $\mu$ L de TE Buffer, deixar por 1 minuto a temperatura ambiente,
- Centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos a 20°C,
- Descartar o filtro e armazenar a -20°C as amostras extraídas e purificadas ou seguir aplicando em gel de agarose a 1% a fim de verificar se foi bem sucedida a purificação da banda em análise.
- Aplicação no gel: 5  $\mu$ L do DNA purificado e 1  $\mu$ L do Tampão de amostra.

**ANEXO III****AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA  
FORMULÁRIO DE COLETA – DADOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS**