



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ELZA CAROLINE ALVES MÜLLER

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ADENOVÍRUS EM
CRIANÇAS COM GASTRENERITE AGUDA GRAVE, APÓS A INTRODUÇÃO DA
VACINA CONTRA ROTAVÍRUS NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.**

Belém – Pará

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ELZA CAROLINE ALVES MÜLLER

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ADENOVÍRUS EM
CRIANÇAS COM GASTREENTERITE AGUDA GRAVE, APÓS A INTRODUÇÃO DA
VACINA CONTRA ROTAVÍRUS NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof. Dra Maisa Silva de Sousa

Co-orientador: Dr. Alexandre da Costa Linhares

Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas – SVS / MS

Belém – Pará

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP)
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Müller, Elza Caroline Alves

Epidemiologia molecular das infecções por adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave, após a introdução da vacina contra rotavírus na cidade de Belém, Pará/Elza Caroline Alves Müller; orientador, Maisa Silva de Sousa. – 2017.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2017.

1. Infecções por rotavírus - Crianças – Belém (PA). 2. Adenovírus – Belém (PA). 2. Crianças – Doenças – Belém I. Sousa, Maisa Silva de, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 618.923427

ELZA CAROLINE ALVES MÜLLER

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ADENOVÍRUS EM CRIANÇAS COM GASTREENTERITE AGUDA GRAVE, APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.

Tese de doutorado apresentada à aprovação, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pela Comissão formada pelos professores:

Banca examinadora:

Aprovado em: 10/02/2017

Dra. Maísa Silva de Sousa - Orientadora
Universidade Federal do Pará, NMT.

Dr. Alexandre da Costa Linhares – Co-Orientador
Instituto Evandro Chagas, MS, SVS.

Dra. Eliete da Cunha Araújo – Avaliador titular
Universidade Federal do Pará, ICS.

Dra. Luana da Silva Soares– Avaliador titular
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia

Dra. Hugo Reis Resque - Avaliador titular
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia

Dra. – Yvone Benchimol Gabbay – Avaliador titular
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia

Dra. Karla Valéria Batista Lima – Avaliador suplente
Universidade do Estado do Pará

A Deus, a minha família e ao Dr. Alexandre Linhares. Por me darem o incentivo necessário para não desistir ante às adversidades da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Evandro Chagas por todo suporte científico e logístico na realização desta pesquisa.

A Universidade Federal do Pará e Núcleo de Medicina Tropical pela oportunidade de capacitação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio para execução do trabalho.

A minha orientadora Dra. Maísa Silva pela disponibilidade em desenvolver esta pesquisa.

Ao co-orientador Dr. Alexandre Linhares minha eterna gratidão por ser aquele que sempre incentivou o meu desenvolvimento acadêmico, repassando os conhecimentos com paciência e dedicação.

A todos da seção de virologia do IEC, às equipes dos Laboratórios de Rotavírus e Norovírus, em especial a Dra. Luana Soares, pelo companheirismo e ajuda ao longo da realização deste.

A minha família (Andrey, Nicole e Nathália) pela compreensão nos períodos de ausência e em especial ao meu pai, Gerhard, por ter investido e acreditado desde o início no meu futuro profissional.

Aos companheiros da UNIFAP que me substituíram para que eu finalizasse este trabalho.

Aos familiares e amigos que sempre estão ao meu lado.

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é nunca desistir.”

Albert Einstein

RESUMO

As gastroenterites são a terceira causa de morbi-mortalidade infantil no mundo, sobretudo entre os menores de 5 anos de idade. Os adenovírus (HAdV) são vírus icosaédricos não envelopados, têm 240 proteínas “hexon” específicas e DNA de fita dupla. Pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus* e estão distribuídos em 7 espécies (A a G) e 57 sorotipos. Estudos epidemiológicos detectaram HAdV em 2 a 14% dos casos de diarreia aguda infantil em hospitais e ambulatórios clínicos. O objetivo deste estudo foi detectar a prevalência, definir o perfil epidemiológico e os tipos de HAdV em crianças hospitalizadas com quadro de gastroenterite e vacinadas contra rotavírus. Foram analisadas 842 amostras fecais, coletadas no período de maio de 2009 a abril de 2011 em Belém, PA, utilizando-se as técnicas de ensaio imunoenzimático e imunocromatografia para triagem e PCR e sequenciamento de nucleotídeos para tipagem e identificação molecular. Os HAdVs foram encontrados em 7,2% (61/842) das amostras testadas, com os adenovírus entéricos (AdE) equivalendo a 50,8% (31/61) dos casos positivos. A análise quanto ao gênero das crianças infectadas demonstrou 7,7% (28/362) de casos do sexo feminino e 6,8% (33/480) do sexo masculino. A positividade para HAdV por faixa etária dos pacientes analisados detectou maior prevalência entre os maiores de 24 meses de idade, correspondendo a 8,9% (16/178). Quanto à distribuição temporal dos HAdV, o mês de junho foi o de maior prevalência, com 11,4% (8/70) do total de casos. A reação de sequenciamento de oligonucleotídeos caracterizou a espécie F como mais prevalente em nossa região, equivalendo a 64,5% (29/45) das amostras sequenciadas, com o tipo 41 detectado em 69% (20/29) dos casos positivos para a espécie F e 31% (9/29) caracterizados como tipo 40. Os resultados obtidos neste estudo confirmam os HAdV infectando uma proporção significativa de menores de 3 anos hospitalizados na cidade de Belém, Pará, demonstrando a importância do estabelecimento de uma vigilância, sobretudo após a implantação da vacina contra rotavírus no Brasil.

Palavras-chave: gastroenterite, adenovírus, ensaio imunoenzimático, PCR, sequenciamento, pós vacinação contra rotavírus.

ABSTRACT

Gastroenteritis are the third cause of infant morbidity and mortality worldwide, especially among children under 5 years old. Adenoviruses (HAdV) are icosahedral non-enveloped viruses, possess 240 proteins "hexon" specific and a double-stranded DNA. They belong to the Adenoviridae family, Mastadenovirus genus, and are assigned to 7 species (A to G) and 57 serotypes. Epidemiological studies found that HAdVs account for 2-14% of cases of acute childhood diarrhea in hospitals and outpatient units. The aim of this study was to determine the prevalence and to assess the epidemiological features of of HAdV infection, as well as the occurrence of types in 842 children under three years of age, hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. All of these children had been vaccinated against rotavirus. These children were selected from a previous rotavirus vaccine case-control study conducted at Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, from May 2009 to April 2011. ELISA and immunochromatography were used for HAdV screening in stool samples and PCR and oligonucleotide sequencing for typing and molecular characterisation. HAdVs were found in 7.2% (61/842) of the tested samples, with the enteric adenoviruses (EAD) accounting for 50.8% (31/61) of the HAdV positive cases. The distribution of HAdV according to the gender showed that 7.7% (28/362) of whom were female and 6.8% (33/480) were male. The highest prevalence rates of HAdV infection were seen among patients older than 24 months of age, corresponding to 8.9% (16/178) of all positive cases. In regards to the temporal distribution, the highest prevalence rate was observed in June, representing 11.4% (8/70) of cases overall. The oligonucleotide sequencing showed that HAdV species F was predominant in our region, accounting for 64.5% (29/45) of the sequenced samples. These samples included HAdV types 41 and 40, detected at rates of 69% (20/29) cases and 31% (9/29), respectively. The results of this study indicate that HAdV accounts for a significant proportion of gastroenteritis among hospitalized children aged less than 3 years, during a post-rotavirus vaccine introduction period in Belém, Pará state, Brazil.

Keywords: gastroenteritis, adenovirus, ELISA, PCR, sequencing, post-rotavirus vaccination

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelos do virion do adenovirus.....	21
Figura 2	Designação das proteínas dos adenovirus e sua localização.....	22
Figura 3	Classificação e condições clínicas dos adenovirus.....	23
Figura 4	Representação diagramática da captação e desnudamento de partículas de adenovirus.....	24
Figura 5	Organização do genoma dos adenovirus.....	25
Figura 6	Mapa de transcrição do adenovirus.....	26
Figura 7	Diagrama do gene hexon com exons 1, 2 e 3.....	27
Figura 8	Micrografia eletrônica de partícula viral de adenovirus.....	33
Figura 9	Efeito citopatogênico (ECP).....	34
Figura 10	Algoritmo exibindo os procedimentos laboratoriais.....	41
Figura 11	Esquema representando a metodologia do teste de EIA.....	42
Figura 12	Esquema representando a metodologia do teste de IC.....	43
Figura 13	Reagentes e respectivos volumes utilizados na PCR.....	45
Figura 14	Condições de termociclagem utilizadas na PCR.....	45
Figura 15	Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes.....	47
Figura 16	Prevalência de adenovirus.....	49
Figura 17	Distribuição dos adenovirus por gênero.....	51
Figura 18	Frequência dos adenovirus de acordo com a faixa etária.....	51
Figura 19	Distribuição mensal dos adenovirus.....	52
Figura 20	Resultados da PCR para o gene hexon.....	53
Figura 21	Resultados dos testes por espécie de adenovirus.....	54
Figura 22	Resultado da genotipagem por espécie e tipo de adenovirus.....	55
Figura 23	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene hexon.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Esquema representativo do projeto de pesquisa e respectivas quantidades de espécimes selecionados para pesquisa de Adenovírus.....	40
Tabela 2.	Resultados dos testes para HAdV obtidos em cada uma das técnicas utilizadas: EIA e IC.....	50
Tabela 3.	Frequência de adenovírus de acordo com a faixa etária das crianças.....	52
Tabela 4.	Frequência de adenovírus de acordo com a data da coleta do espécime fecal das 842 crianças participantes de estudo pós-vacinação contra rotavírus.....	53
Tabela 5.	Resultados da análise filogenética, exibindo o perfil de similaridade nucleotídica entre amostras fecais positivas para HAdV e sequenciadas para o gene hexon.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: graus centígrados

µL: microlitro

AdNE: Adenovírus não-entérico

Ac: Anticorpos

Ag: Antígenos

BM: Banho maria.

CaCl: Cloreto de cálcio

Ca⁺⁺: Íons cálcio.

cDNA: DNA complementar.

dNTP: 2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato.

EGPA: Eletroforese em gel de poliacrilamida

EGA: Eletroforese em gel de agarose

EIE: Ensaio imunoenzimático.

FC: Fixação do complemento

FDA: Food and Drug Administration.

Fe: Ferro

HAdE: Adenovírus entéricos

HAdV: Adenovírus

IC: Imunocromatografia.

IH: Inibição da hemaglutinação

IEC: Instituto Evandro Chagas

IF: Imunofluorescência

IgA: Imunoglobulina A.

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

IRA: Infecção respiratória aguda

IS: Intussuscepção intestinal

ITR: Inverted Terminal Repeat

kDa: kilo Dalton

mA: mili-Ampère.

ME: Microscopia eletrônica

mg: miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: mililitro

NaCl: Cloreto de sódio.

ng: nanogramas

NIH: National Institutes of Health

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: pares de bases

PBS: Solução salina fosfatada tamponada.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

RV: Rotavírus

SN: Soroneutralização.

TA: Temperatura ambiente.

TBE: Tris-borato-EDTA.

TN: Teste de neutralização.

Tris-Ca⁺⁺: Tris-cálcio.

TRO: Terapia de reidratação oral.

V: volts

W: watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1	ADENOVÍRUS.....	19
3.1.1	Histórico.....	19
3.1.2	Estruturas morfológica, genômica e protéica.....	20
3.1.3	Classificação.....	22
3.1.4	Biossíntese viral.....	23
3.1.5	Expressão gênica.....	25
3.1.6	Gene hexon.....	26
3.1.7	Epidemiologia.....	27
3.1.8	Fisiopatologia.....	29
3.1.9	Quadro clínico.....	29
3.1.10	Imunidade.....	31
3.1.11	Diagnóstico.....	32
3.1.12	Tratamento.....	36
3.1.13	Vacinas.....	37
4	MATERIAL MÉTODOS.....	39
4.1	ÁREA DE ESTUDO.....	39
4.2	CASUÍSTICA.....	39
4.3	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	40
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.5	TÉCNICAS EMPREGADAS.....	41
4.5.1	Ensaio Imunoenzimáticos.....	41
4.5.2	Ensaio Imunocromatográfico.....	43
4.5.3	Técnicas de caracterização molecular.....	43
4.5.3.1	Extração do genoma viral.....	44
4.5.3.2	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	44
4.5.3.3	Purificação do produto da PCR.....	45

4.5.3.4	Quantificação do DNA.....	46
4.5.3.5	Reação de sequenciamento de nucleotídeos.....	46
4.5.3.6	Purificação do produto da reação de sequenciamento.....	47
4.5.3.7	Eletroforese em sequenciador automático.....	47
4.5.3.8	Alinhamento e edição das sequências.....	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	PREVALÊNCIA DE ADENOVÍRUS.....	49
5.2	CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	49
5.3	CASOS DE COINFEÇÃO ENTRE ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS.....	50
5.4	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS CRIANÇAS INFECTADAS POR ADENOVÍRUS.....	50
5.5	AVALIAÇÃO DA TEMPORALIDADE E SAZONALIDADE DAS INFECÇÕES.....	52
5.6	DIVERSIDADE SOROTÍPICA E GENOTÍPICA DAS INFECÇÕES.....	53
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÕES.....	67
8	REFERÊNCIAS.....	67
9	ANEXO A.....	79

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 7 milhões de crianças menores de 5 anos morrem todo ano nos países mais pobres por doenças infecciosas e parasitárias, principalmente pneumonia, diarreia e HIV/AIDS (GBD, 2015).

As gastroenterites agudas constituem um problema de impacto mundial em termos de saúde pública, representando a segunda causa de morte por doenças infecciosas entre crianças com menos de 5 anos em todo o mundo, associando-se a 578.000 óbitos ao ano (GBD, 2015; LIU et al, 2016). Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), apenas 39% das crianças atingidas por tal agravo nos países em desenvolvimento recebem tratamento adequado (UNICEF, 2008; RUDAN, 2010).

As doenças diarreicas agudas ocupam lugar de destaque na morbimortalidade infantil, estimando-se que anualmente cerca de 1,3 bilhão de episódios diarreicos possam acometer crianças com até 5 anos de idade. Num país em desenvolvimento, esses menores podem apresentar de três a cinco episódios diarreicos por ano (MISODOR, 2008). Essa doença também pode ser considerada a segunda ou terceira causa de consulta nas emergências, sobrecarregando os serviços de saúde (BLACK, 2014).

No Brasil, entre 2000 e 2010, houve 22.933 mortes de crianças com idades inferiores a cinco anos, devido às doenças diarreicas (80,3% delas em menores de um ano), e 1.209.622 internações (62,6% entre um e quatro anos) (MENDES et al, 2013). As microrregiões situadas nas regiões Norte e Nordeste apresentaram em 2009 maiores taxas de mortalidade por gastroenterite aguda (5 e 4 vezes mais, respectivamente), entre os menores de um ano de idade, do que a região Sul (BÜHLER et al., 2014).

Dados demográficos indicam que a taxa de mortalidade infantil entre os menores de cinco anos no estado do Pará foi de 24,1 óbitos para cada mil nascidos vivos em 2012. Em Belém, nos anos de 2009 e 2010, a mortalidade infantil era de 16,3 e 16,9, para cada 1000 nascidos vivos, respectivamente. No entanto, para os menores de um ano a mortalidade em 2013 foi de 4,7%, sendo que grande parte desses óbitos ocorreu por doença diarreica (DATASUS, 2013).

A gastroenterite aguda é geralmente causada por um agente de origem infecciosa que infecta os enterócitos da mucosa intestinal e desencadeia alteração

na absorção de água, eletrólitos e nutrientes. O resultado pode ser a desidratação grave, choque hipovolêmico e a evolução para o óbito (TOPOROVISIKI et al., 1999).

Até os anos 1970, as técnicas de diagnóstico empregadas na identificação da etiologia infecciosa das diarreias eram limitadas à pesquisa de bactérias, protozoários e helmintos. Não obstante, diversos investigadores já questionavam, por exclusão, o papel dos vírus na maioria dos casos, uma vez que aproximadamente dois terços ficavam sem uma definição etiológica (KAPIKIAN e CHANOCK, 2007).

Com o advento da microscopia eletrônica (ME) e o uso de técnicas virológicas específicas, ficou evidenciada a importância que os vírus assumem na etiologia das gastroenterites infantis, demonstrando seu envolvimento de forma tão ou mais importante do que outros patógenos. Dentre esses vírus se destacam os rotavírus do grupo A (RV), norovírus, adenovírus entéricos tipos 40 e 41 (AdE) e astrovírus (WILHELMI E SANCHEZ, 2003).

Os adenovírus humanos (HAdV) estão amplamente distribuídos no mundo e se relacionam a uma variedade de processos mórbidos que inclui doenças respiratórias, conjuntivite, uretrite, intussuscepção e gastroenterite (WOLD e ISON, 2013). Os que estão relacionados com a gastroenterite acometem principalmente crianças com idade inferior a dois anos, assim como indivíduos imunocomprometidos de qualquer faixa etária, podendo levar à morte (MUNOZ et al., 1998; WILHELMI et al., 2003).

Devido ao impacto do RV na saúde pública, no Brasil, desde 2006, foi introduzida no calendário básico de imunizações para crianças a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), Rotarix®, produzida pela *GlaxoSmithKline Biologicals* (Rixensart, Bélgica), que obteve resultados satisfatórios quanto à eficácia contra gastroenterites graves e hospitalizações por esses agentes virais (LINHARES e BREESE, 2000; LINHARES e VILLA, 2006; LINHARES et al., 2008; MASCARENHAS e LINHARES, 2005; CARVALHO-COSTA et al., 2009).

A vacina Rotarix®, de origem humana, genótipo G1P[8], foi avaliada na Finlândia e em onze países da América Latina, obtendo-se eficácia de até 100% contra os episódios mais graves de diarreia por RV (LINHARES e JUSTINO, 2015; RUIZ-PALACIOS et al., 2006; VESIKARI et al., 2006). Essa vacina foi também testada em Belém e apresentou eficácia de 86% e 93% contra gastroenterites graves e hospitalizações por RV, respectivamente (ARAÚJO et al., 2007). Presentemente, a

VORH faz parte do calendário oficial estabelecido pelo Programa Nacional de Imunizações e se encontra disponível nos postos de saúde para ser administrada em duas doses, via oral, aos segundo e quarto meses de idade (BRASIL, 2006).

Após a introdução da Rotarix® no Brasil e em vários países no mundo, diversos outros agentes virais, aí se incluindo os HAdVs, passaram a adquirir maior importância como causa de gastroenterites na infância. Tal contingência reforça a necessidade de incluir os HAdVs, entre outros enteropatógenos, no contexto da vigilância epidemiológica oficial. Daí podem decorrer medidas de prevenção e controle que concorram para a melhoria das condições de saúde da população, particularmente as crianças.

Diversos estudos realizados em diferentes regiões caracterizaram os RV como principal causa de gastroenterite aguda entre crianças menores de cinco anos de idade (TATE, 2011a; DASHTI et al, 2016). Apesar disso, aproximadamente 25% dos casos de diarreia continuavam sem uma definição etiológica (KOTLOFF et al.,1989). Logo, constatou-se a necessidade de se estudarem outros agentes virais que pudessem estar implicados nesses casos sem causa definida, tais como os HAdVs.

Estudos epidemiológicos sobre as infecções entéricas em todo o mundo sustentam a importância dos HAdVs como agente etiológico de gastroenterite. Ao contrário dos estudos sobre RV, numerosos desde sua descoberta há quatro décadas, a literatura concernente às gastroenterites por HAdV apresenta longos períodos sem a adição de novas e relevantes informações.

Apesar dessa limitação na literatura, foi demonstrada a circulação de HAdV causando gastroenterite nas populações adulta e infantil, com taxas de prevalência entre 4 e 22% (HAMKAR et al, 2010; SHOKROLLAHI et al, 2014; REYMÃO et al, 2016; LIU et al, 2016).

Há que se considerar que os HAdVs já foram caracterizados previamente como a segunda causa de gastroenterite entre os menores de 2 anos de idade (LIU et al, 2016)

Um estudo realizado, voltado à pesquisa de HAdV em Belém do Pará, com 1.160 amostras provenientes dos períodos pré- e pós-vacinação contra RV, alcançou positividade de 7,2% quanto à presença desses vírus. Os adenovírus entéricos (HAdE), particularmente, foram detectados em 5% (58/1160) do total de amostras, correspondendo a 69% (58/84) das amostras positivas (n = 58). No

período pré-vacinação, a positividade foi de 5,78% (44/760) dos espécimes testados, enquanto que após a introdução da vacina contra RV registrou-se 10% (40/400) de espécimes positivos para HAdV (MÜLLER, 2011).

A realização deste estudo de vigilância após à introdução da vacina contra RV no Brasil contempla importantes informações adicionais a respeito da prevalência dos HAdV nos quadros de gastroenterite infantil, especialmente dos tipos entéricos 40 e 41. Acresçam-se a isto novas informações a respeito da circulação de outras espécies de HAdV como causa de gastroenterite.

São raros os estudos que tenham determinado a diversidade genotípica inerente às infecções por HAdV, pois alguns apenas se estendem além da detecção e do enfoque na prevalência. Portanto, estudos de vigilância de agentes virais relacionados à gastroenterite aguda em crianças vacinadas contra RV são importantes para identificar eventuais mudanças no perfil dessas infecções.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever os aspectos epidemiológicos da infecção por adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave após a implementação da vacina contra rotavírus, na cidade de Belém, Pará, durante o período de maio de 2009 a abril de 2011.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a prevalência de HAdV em crianças com gastroenterite aguda vacinadas contra RV.
- b) Comparar os resultados obtidos pelas técnicas de diagnóstico sorológico para HAdV.
- c) Identificar a frequência de coinfeções envolvendo HAdV e RV.
- d) Descrever o perfil epidemiológico das infecções por HAdV.
- e) Analisar as características de temporalidade e sazonalidade das infecções por HAdV.
- f) Determinar a diversidade genotípica das infecções por HAdV de origem humana.
- g) Descrever as relações filogenéticas das amostras de HAdV.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ADENOVÍRUS

3.1.1. Histórico

Os HAdVs foram isolados e caracterizados como agentes virais por dois grupos de pesquisadores que estudavam a etiologia das infecções respiratórias agudas. Em 1953, Rowe e colaboradores observaram a degeneração de culturas primárias de adenóides humanas (ROWE et al, 1956). Apenas em 1956 foram denominados adenovírus, devido ao tecido no qual foram descobertos (ROWE et al, 1958).

A capacidade desses vírus de induzir tumores em roedores (HAdV tipo 12) e transformar células “in vitro” estabeleceu os adenovírus como um modelo importante nos estudos da oncogênese, originando a primeira descrição de um vírus de origem humana induzindo tumor maligno em animal (TRENTIN et al., 1962).

Em 1960 foi desenvolvida uma vacina contra os HAdV pertencentes aos sorotipos 4 e 7, pois eram responsáveis por elevada morbidade na população de recrutas militares, contingente humano sob maior risco de contrair doença respiratória aguda (GAYDOS e GAYDOS, 1995).

Em 1973, um tipo de HAdV foi isolado em células de carcinoma de útero humano (HeLa), a partir das fezes de uma criança com gastroenterite na Holanda. De 1979 a 1983 vários HAdVs foram isolados de crianças com diarreia e/ou vômito na Holanda e noroeste da Alemanha (SANTOS e SOARES, 2015).

Em 1975, o HAdV foi observado por ME a partir de amostras fecais provenientes de crianças em surto de gastroenterite (FLEWETT, 1976). Essas partículas virais não foram cultiváveis e, devido à sua característica de difícil replicação nos sistemas celulares convencionais, os adenovírus entéricos (HAdE) foram denominados adenovírus fastidiosos (BLACKLOW e GREENBERG, 1991).

Atualmente, os HAdEs são considerados agentes etiológicos importantes da doença diarreica infantil em todo o mundo. Isso, além de afetarem jovens e adultos em períodos de surtos, havendo também evidências de transmissão nosocomial (SANTOS E SOARES, 2015).

A utilidade do estudo de HAdV nos dias de hoje refere-se ao uso deste como importante vetor na terapia genética, sendo ainda objeto de intensa investigação. Neste caso, podem ser usados como vetores de expressão de genes em desenvolvimento de vacinas (BERK, 2013).

3.1.2. Estrutura morfológica, genômica e proteica

Os HAdVs são vírus não envelopados que possuem simetria icosaédrica (20 faces), diâmetro de aproximadamente 90nm e fibras semelhantes a antenas de 28 a 33 nm, sendo projetadas dos vértices do icosaedro (Figuras 1A e 1C). As partículas (virions) têm massa de 150×10^6 D, a qual contém 13% de DNA e 87% de proteínas (Figura 1 C). Seu genoma é constituído por DNA de fita dupla, linear e não-segmentado, com 30 a 38 Kb (HALL, 2010; BERK, 2013).

O capsídeo dos HAdVs é formado por 252 capsômeros. Destes, 240 são hexagonais – os “héxons” – e contêm, em todos os adenovírus, os antígenos grupo-específicos. Os restantes 12 capsômeros – os “pentons” – são pentagonais e, a partir dos mesmos, se projetam os doze filamentos já citados; os “pentons” contêm o antígeno tipo-específico (DIETRICH, 1979). Os determinantes antigênicos estão localizados no hexon e na fibra (Figura 1B). Na superfície interna do hexon se encontra o determinante alfa, que é o antígeno gênero-específico comum a todos os HAdVs do mesmo gênero. O epsilon do hexon e o gama da fibra caracterizam os sorotipos (RUSSELL, 2009).

A fibra é subdividida em três regiões: porção globular (Knob), haste e cauda. Os capsídeos da maioria dos sorotipos de HAdV apresentam apenas um tipo de fibra, enquanto que os das espécies F e G codificam proteínas para fibras curtas e longas (RUSSEL, 2009). O tamanho da fibra varia de acordo com o sorotipo. Os epítomos das proteínas formadoras das fibras possuem atividade de hemaglutinina e de neutralização, e são ainda responsáveis pela adsorção à célula do hospedeiro (BERK, 2013).

As partículas de adenovírus contêm DNA, proteínas e apresentam traços de carboidratos porque a proteína da fibra do vírion é modificada por adição de glicosamina (BERK, 2013). O vírion é constituído de 11 proteínas numeradas de II a IX, IIIa, μ , TP (proteína terminal, mais a p23 (protease viral), conforme se observa na Figura 1 D, e a descrição apresenta-se na Figura 2 (LIU, 2010).

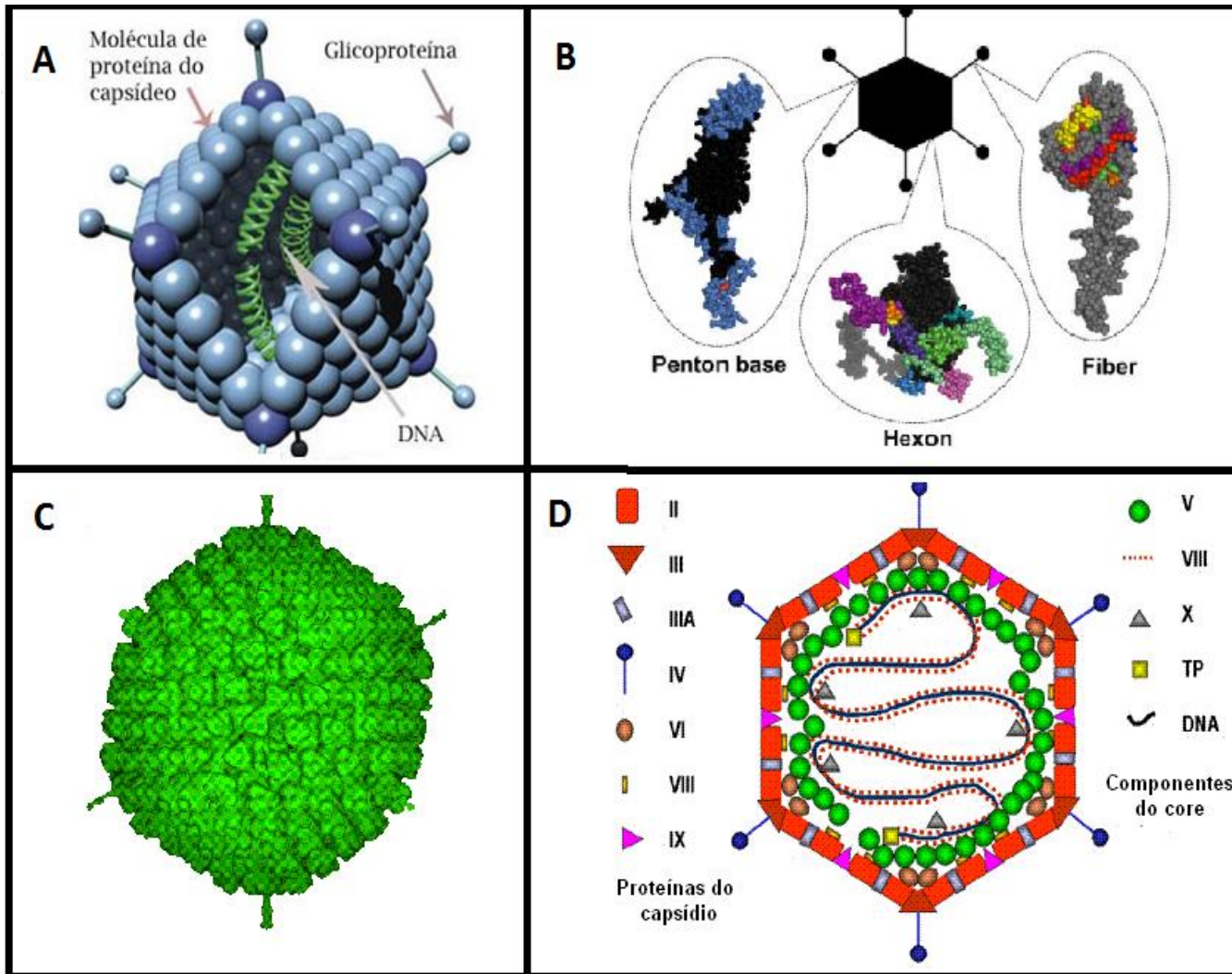


Figura 1: Modelos do virion do adenovírus. **A:** Morfologia interna e externa do Adenovírus. **Fonte:** www.slimfilms.com. **B:** Partícula demonstrando as três maiores proteínas de superfície do capsídeo: penton, hexon e fibra (através de seus monômeros). **Fonte:** Viruses (2015). **C:** Reconstrução de imagem tridimensional da partícula intacta do adenovírus vista em conjunto com um icosaedro tri-axial. **D:** Uma seção estilizada da partícula do adenovírus baseada na compreensão atual dos seus componentes polipeptídicos e DNA. Os constituintes virais são designados por seus números de polipeptídeo com exceção da proteína terminal (TP). **Fonte:** Adaptado de Fields et al., Fundamental Virology (1996).

Proteína	Localização	Aa	Função conhecida
II	Monômero hexon	952	Estrutural
III	Base do penton	571	Penetração
IIIa	Associado a base do penton	585	Penetração, montagem
IV	Fibra	581	Ligação ao receptor celular
IV	A2	449	
V	Core (associado ao DNA e a base do penton)	368	Histona-like, “empacotamento”
VI	Peptídeo do hexon	250	Estabilização do capsídeo, do core e rompimento da membrana do endossoma
VII	Core	174	Histona-like
VIII	Peptídeo do hexon	227	Estabilização do capsídeo e do core, montagem da partícula
IX	Peptídeo do hexon	140	Estabilização do capsídeo e do core, montagem da partícula
TP	Genoma		Replicação do DNA viral
μ	Core	36	Ligação ao DNA viral
p23	Core		Protease

Figura 2: Designação das proteínas dos adenovírus, sua localização e funções.

Fonte: Adaptado de LIU, 2010.

O genoma “codifica” seis unidades de transcrição iniciais (precoces): E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4; 3 unidades intermediárias (IX, IVa2e E2 tardio). Posteriormente, uma unidade de transcrição tardia (MLP), que, em seu processamento, gera cinco famílias de RNAs mensageiros tardios (L1, L2, L3, L4 e L5), todos transcritos pela RNA polimerase II (BERK, 2016).

3.1.3. Classificação

A família *Adenoviridae* é subdividida em cinco gêneros: *Aviadenovirus* (tem como hospedeiro as aves), *Mastadenovirus* (responsáveis por infectar mamíferos), *Atadenovirus* (infectam marsupiais, répteis e aves), *Siadenovirus* (isolados de répteis, pássaros e marsupiais) e *Ichtadenovirus* (infectam algumas espécies de esturjão) (BENKO et al., 2002, 2005; CARSTENS, 2010). Com base em características biológicas, imunológicas, bioquímicas e genéticas, os adenovírus humanos estão classificados em 57 sorotipos, distribuídos em 7 espécies designadas de A a G (DAVISON E BENKO, 2003; JONES et al., 2007; HALL et al., 2010).

O gênero *Mastadenovirus* é formado por mais de 90 sorotipos. No entanto, os sorotipos mais comumente envolvidos em casos de gastroenterite são os 40 e 41, da espécie F (adenovírus entéricos), os tipos 12, 18 e 31, da espécie A (BROWN et al, 1996), e o recentemente incluído tipo 52, pertencente à espécie G (JONES et al., 2007). Os tipos 2, 5 e 6, da espécie C (BAUM, 2000; HORRWITZ, 2001), raramente estão envolvidos na etiologia da diarreia (WILHELMI et al., 2003). No entanto, o tipo 1 da espécie C pode estar relacionado à gastroenterite. A classificação dos adenovírus segundo a espécie e o sorotipo pode ser observada na Figura 3 (BENKO, 2008).

Espécie	Sorotipo	Manifestações Clínicas
A	12,18 e 31	Gastroenterite
B	3, 7, 16, 21, 50 e 55 11, 14, 34 e 35	Infecção respiratória aguda (IRA), Febre, Conjuntivite, Faringite, Pneumonia, Gastroenterite. Cistite hemorrágica.
C	1, 2, 5, 6 e 57	IRA, ocular e gastroenterite.
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22- 30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54 e 56	Ceratoconjuntivite epidêmica; Ceratoconjuntivite esporádica. Gastroenterite
E	4	IRA e conjuntivite
F	40, 41	Gastroenterite
G	52	Gastroenterite

Figura 3: Classificação e condições clínicas dos seres vivos associados aos adenovírus.
Fonte: Adaptado de BENKO, 2008.

3.1.4. Biossíntese viral

A biossíntese viral leva cerca de 30 horas e resulta na produção de aproximadamente 100.000 novas partículas por célula. Ocorre no núcleo celular e está dividida em fases inicial, intermediária e tardia. Os eventos iniciais compreendem as etapas de adsorção, penetração, transcrição e tradução dos genes iniciais, os quais posteriormente irão regular a expressão dos genes virais e a replicação do DNA (Figura 4). Os genes iniciais também induzem a progressão do ciclo celular e bloqueiam a apoptose. Na fase tardia ocorre o início da replicação do DNA, com expressão de um novo grupo de genes virais tardios e a montagem da progênie viral (BERK, 2013).

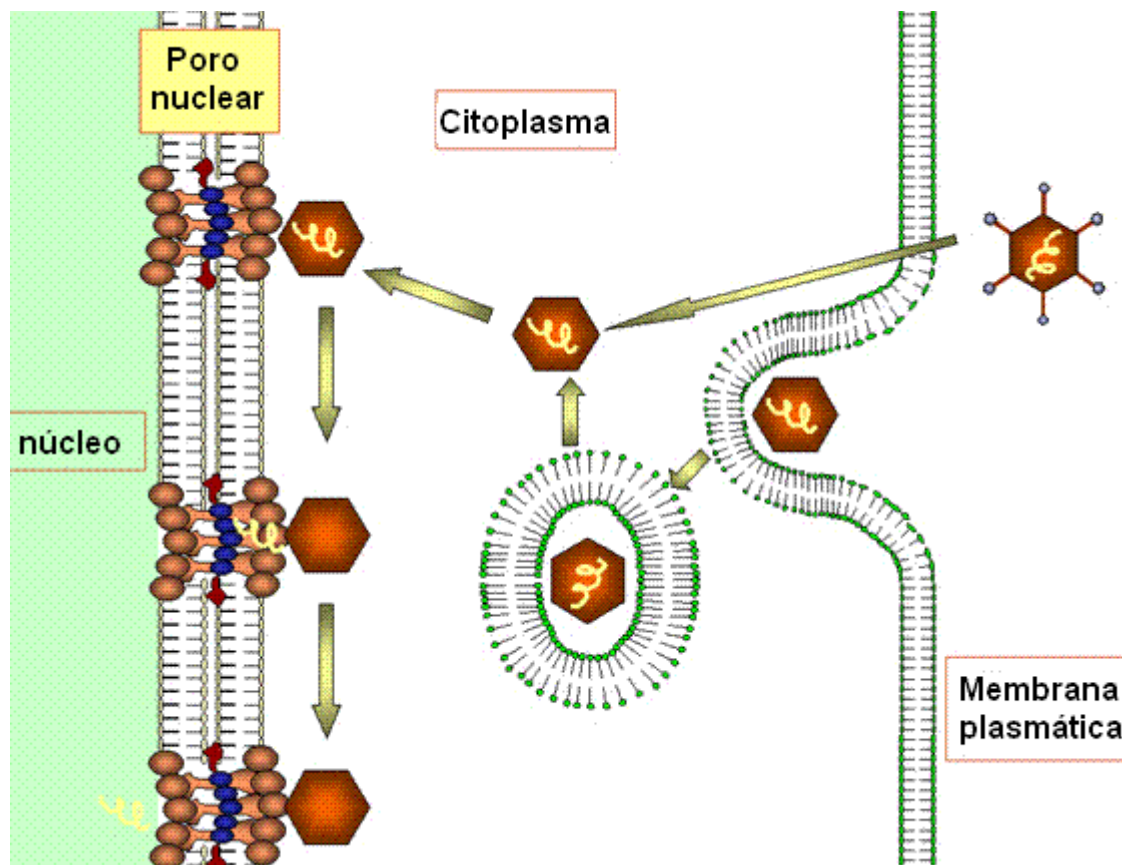


Figura 4: Representação diagramática da captura e desnudamento de partículas de adenovírus.
Fonte: Adaptado de Zinsser Microbiology 20th Ed.

A adsorção dos HAdV dos tipos A, C, D, E e F ocorre através da ligação da fibra a um receptor da membrana plasmática denominado CAR (*Coxsackie-virus B and Adenovirus receptor*), sendo este um componente das junções das células epiteliais. Os adenovírus do tipo B utilizam como receptor a molécula CD46 (SANTOS e SOARES, 2008). Após a adsorção, a base do penton se liga às integrinas da superfície celular. Ocorre remoção da fibra e internalização da partícula por endocitose. A partícula é parcialmente desmontada antes de ser liberada no citoplasma, com o core entrando no núcleo através de poros e convertido em complexo DNA viral-histonas celulares (WICKHAM et al., 1993; SETH et al., 1994).

Após esta etapa, a RNA polimerase II celular transcreve os RNAs mensageiros iniciais e os RNAs tardios. Mecanismos de *splicing* resultam em várias cópias de RNAs e as proteínas produzem o genoma viral. A síntese do DNA viral ocorre com auxílio da proteína terminal (TP), a DNA-binding-protein (DBP) e a DNA-pol. Os genes tardios, que codificam proteínas estruturais, são transcritos, processados e transportados para o citoplasma, onde acontece a síntese proteica viral. A montagem da partícula ocorre no núcleo, porém, os capsômeros de hexons e

pentons são montados no citoplasma. A liberação dos vírions da célula infectada está associada com o deslocamento de componentes do citoesqueleto e com a proteína E3-11, também denominada ADP (*adenovirus death protein*), que levam a lise celular (SANTOS E SOARES, 2015).

3.1.5. Expressão gênica

Os HAdV apresentam organização genômica na qual são identificadas duas origens de replicação, presentes em cada segmento terminal do genoma e oito unidades de transcrição, dependentes de RNA polimerase II, sendo seis unidades de transcrição inicial (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4), duas unidades de transcrição intermediária (pIX e pIVa2) e a unidade de transcrição tardia principal (MLTU), a qual gera 5 famílias de RNAsm (L1 ao L5) (SHENK, 1996). O cromossoma viral também pode conter uma ou duas regiões de transcrição de pequenos RNAs (VA-RNA), transcritos pela RNA polimerase III (KIDD et al., 1995, SHENK, 1996) (Figura 5).

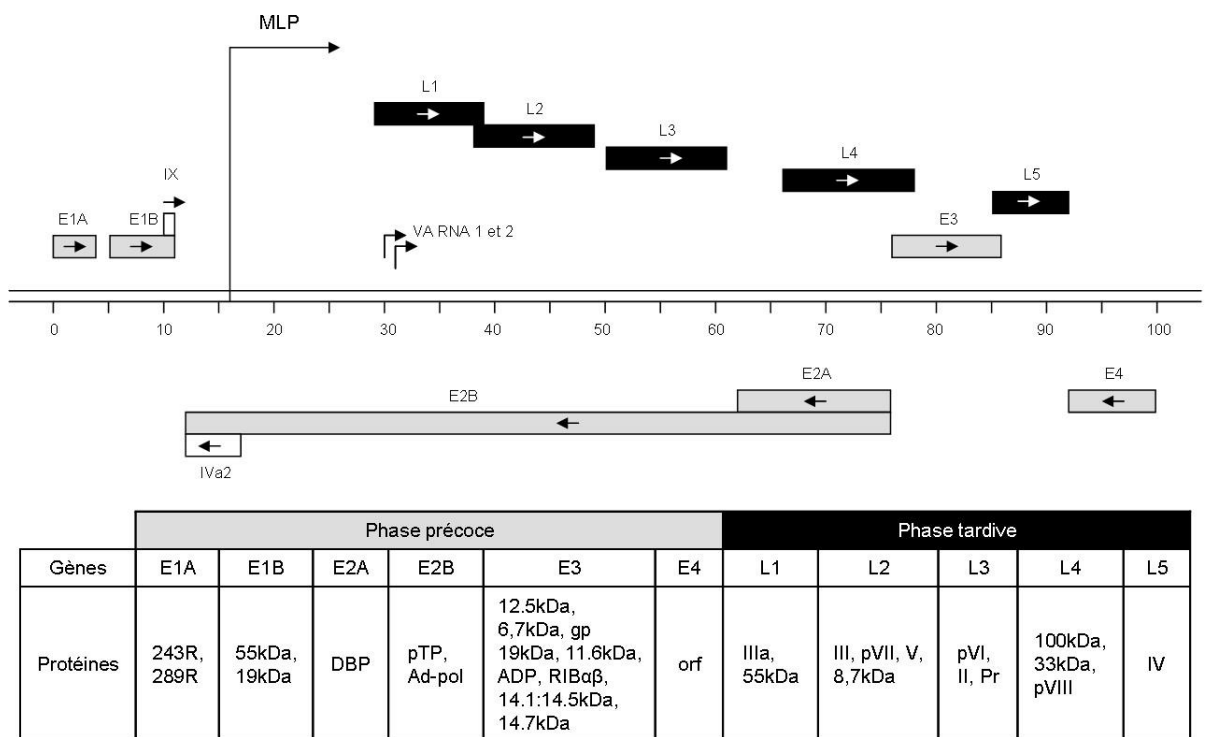


Figura 5: Organização do genoma dos adenovírus: “P” indica os percursos. MLP são as iniciais do principal sítio promotor tardio. O peso da proteína é expresso em quilo Dalton. As setas indicam a direção de transcrição das regiões. O sistema considera os promotores de vários genes em uma região. **Fonte:** AKUSJÄRVI et al., 1986.

A análise dos genomas sequenciados demonstrou que nas extremidades de cada molécula de DNA são encontradas as RTIs (repetições terminais invertidas),

que variam de 36 pb (pares de base) até mais de 200 pb, dependendo do sorotipo, as quais são importantes durante a replicação do genoma. Cada terminal 5' do DNA do vírus é covalentemente ligado a uma *TP* (proteína terminal), que desempenha um papel fundamental na iniciação da replicação do DNA viral, conforme pode ser observado na Figura 6 (HALL et al., 2010).

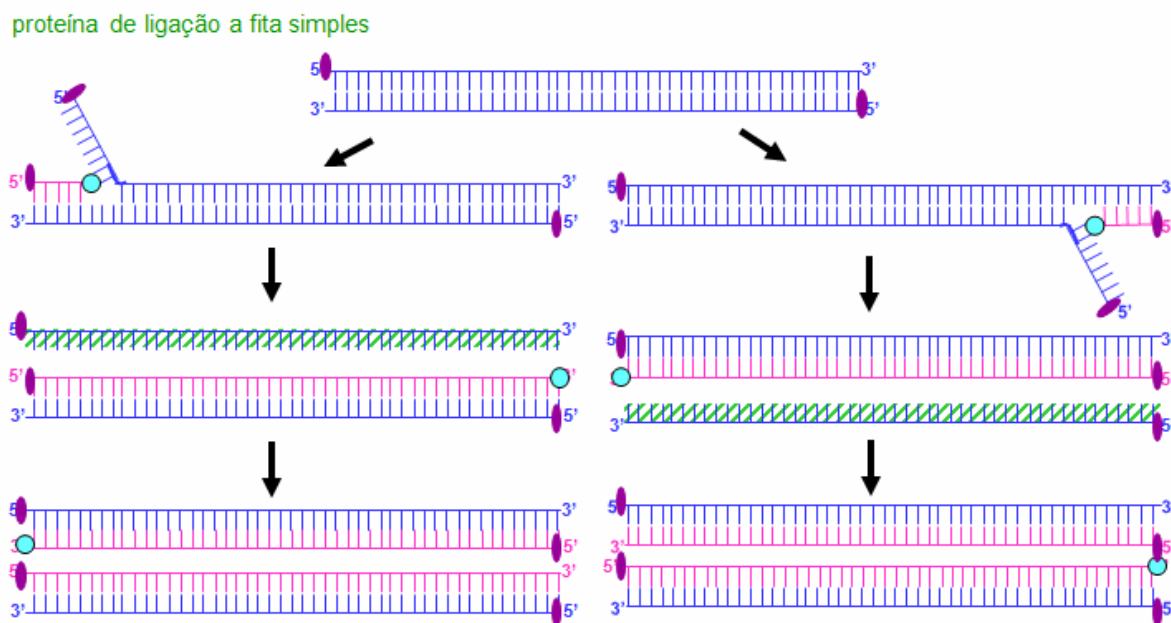


Figura 6: Mapa de transcrição do adenovírus. Genes iniciais são mostrados em vermelho. Verde indica genes tardios. Linhas azuis indicam DNA. Colchetes indicam a posição de promotores. Transcritos primários são feitos a partir de cada promotor e em seguida sofrem splicing alternativo, o diagrama acima não mostra o transcrito primário. Mostra apenas aquelas regiões presentes nos produtos do splicing alternativo. Regiões ausentes indicam íntrons removidos. **Fonte:** Adaptado de Broker, 1984.

3.1.6. Gene hexon

O gene hexon possui uma região hipervariável e codifica o mais importante proteoma para classificação e reconhecimento sorotipo-específico (Figura 7). A parte remanescente da proteína hexon (765 aa) mostrou uma pequena variabilidade entre diferentes sorotipos de adenovírus, indicando que o gene hexon pode ser o mais conservado componente do genoma adenoviral. No entanto, o número de sorotipos de HAdV com a sequência completa de informações sobre o gene hexon ainda é muito limitada (CRAWFORD-MIKSA E SCHNURR, 1996).

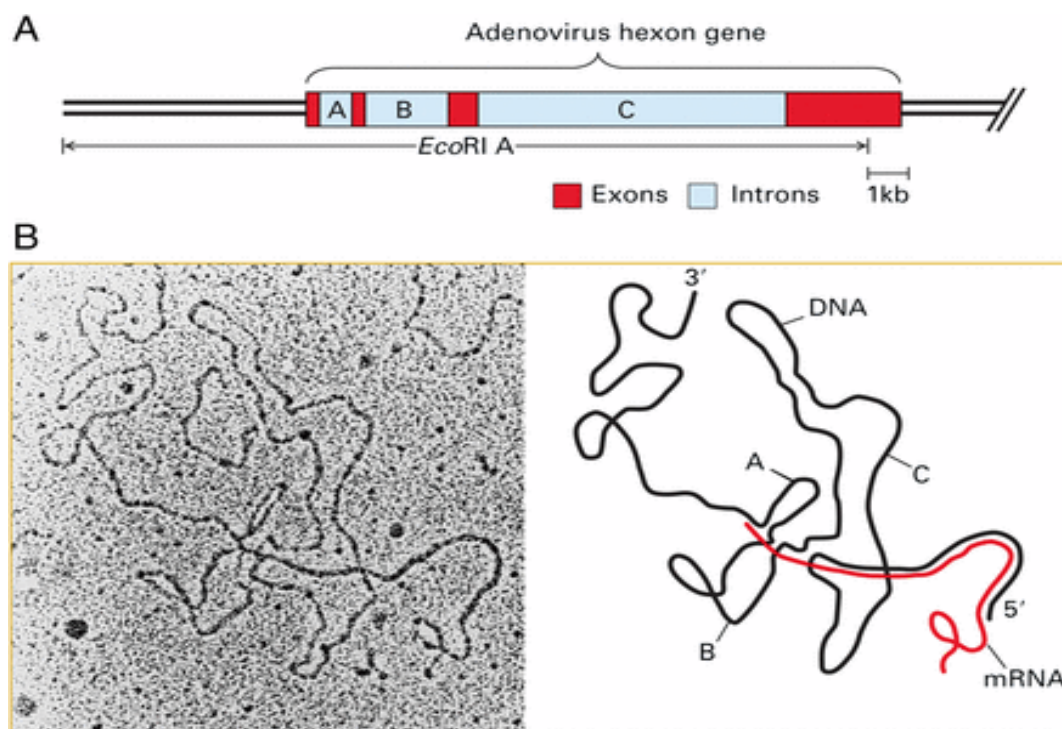


Figura 7: Diagrama do hexon gene. A: com exons 1, 2 e 3. **B:** Micrografia eletrônica de um híbrido de mRNA do hexon gene. **Fonte:** BERK, 2016.

3.1.7. Epidemiologia

Estudos epidemiológicos sobre as infecções entéricas em todo o mundo confirmam a importância dos HAdVs como agente etiológico de doença diarreica em menores de 5 anos de idade (DASHTI et al, 2016). Ao contrário dos estudos sobre RV, numerosos desde sua descoberta, a literatura concernente às gastroenterites por HAdV apresenta longos períodos sem a adição de novas informações.

Os HAdVs podem estar relacionados à segunda ou terceira causa de diarreia não bacteriana entre crianças menores de 3 anos de idade (BARRELLA et al, 2009; LIU et al, 2016). Estudos epidemiológicos desenvolvidos em diversos países demonstram que os HAdV foram detectados em 2 a 20% dos casos de gastroenterite aguda infantil em hospitais e ambulatórios (MOTAMEDIFAR et al, 2013; SHOJA et al, 2014).

De um modo geral, os adenovírus já foram detectados em amostras fecais de crianças causando gastroenterite aguda infantil em diversos países como citados a seguir: 6,9 % nos EUA; 8% na Suécia; 8,3% na Alemanha; 7,9% no Reino Unido; 6,7% no Irã; 10,8% na China; e 4% na Indonésia. Estes dados comprovam que,

mesmo em baixas prevalências, os adenovírus podem ser encontrados em diferentes áreas do mundo (WORLD e ISON, 2013).

Em um estudo multicêntrico conduzido na Ásia, utilizando-se PCR, 4,4% dos pacientes pediátricos com diarreia estavam infectados com os sorotipos de adenovírus mais frequentes, HAdV 40 e 41 (LI et al., 2005). Já a pesquisa destes agentes virais realizada em uma escola elementar de uma cidade de Portugal, identificou um surto de gastroenterite causado pelo HAdV 41 (GONÇALVES et al., 2010). Outra pesquisa feita em Los Angeles (EUA), em 2007, conseguiu identificar um novo sorotipo (HAdV 52), semelhante ao HAdV 41, isolado de cinco pacientes com gastroenterite (JONES et al., 2007).

Estudos epidemiológicos realizados com crianças e adultos em Nova Iorque e Seattle mostraram que os sorotipos HAdV1, HAdV2 e HAdV5 são os mais comuns e estão presentes em 40 a 60% das crianças. Já os tipos HAd3, HAd4 e HAd7 são pouco frequentes. No entanto, entre os adultos, a incidência ocorre de maneira inversa, sendo os tipos HAdV 1, HAdV 2 e HAdV 5 menos frequentes e os HAdV 3, HAdV 4 e HAdV 7 mais comumente encontrados neste grupo (FOX et al., 1969).

No Brasil, um estudo com 268 crianças de nível sócio econômico baixo na cidade de Belo Horizonte, relatou a presença de HAdV em 4,4% das amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda grave há mais de 7 dias (DUARTE, 2012). E em Rondônia, os HAdV foram detectados em 6,4% das crianças menores de cinco anos hospitalizadas com diarreia aguda (MAGALHÃES et al., 2007).

Uma pesquisa para detecção de HAdV realizada em São Luis, Maranhão, com 245 amostras diarreicas e não diarreicas obteve-se um total de 21 casos positivos para HAdV (8.6%). Os HAdE foram detectados em 3,3% das amostras (8/243) e os AdNE estavam presentes em 5,3% das amostras (13/245) (FERREIRA et al., 2004).

A análise molecular de um estudo realizado com crianças no período pré- e pós- vacinação contra RV em Belém, utilizou um total de 30 amostras positivas para HAdV. O resultado apontou 70% (21/30) positivas para a espécie F, sendo 85,7% (18/21) do subtipo 41 e 14,3% (3/21) pertencentes ao tipo 40. Uma amostra possivelmente continha os tipos 40 e 41 simultaneamente. Observou-se um percentual de 30% (9/30) das crianças infectadas com AdNE, sendo 20% (6/30) da espécie A e 10% (3/30) agrupadas com a espécie C. Dentre as que foram positivas para espécie A, 3 eram do tipo 31, 2 do tipo 12 e uma amostra do tipo 18. Enquanto

entre as agrupadas com a espécie C, 2 eram do tipo 2 e uma do tipo 1 (MÜLLER, 2011).

3.1.8. Fisiopatologia

A transmissão dos HAdV pode ocorrer por contato direto ou indireto, aerossóis, secreções oculares e respiratórias e, no caso dos HAdE, através da via fecal-oral por água, alimentos e fômites contaminados (SANTOS E SOARES, 2015).

Os HAdV podem infectar e se multiplicar em vários sítios do organismo, sobretudo nos tratos respiratórios, gastrintestinal e ocular. Em menor escala, também podem infectar o fígado, bexiga urinária, pâncreas, miocárdio e sistema nervoso central. As infecções incluem faringite, conjuntivite, infecções respiratórias, bronquiolite e gastroenterite, além de cistite, miocardites e meningites (JIANG, 2006).

O tropismo celular dos adenovírus é variado e pode causar infecções líticas em células mucoepiteliais do trato respiratório e gastrointestinal, bem como na conjuntiva, atingindo o tecido linfóide onde pode causar infecções persistentes ou ainda ingressar na corrente circulatória e produzir infecções em outros tecidos do organismo (FLOMENBERG e GUTIERREZ, 1997).

Esses agentes virais, após ultrapassarem as barreiras do trato gastrintestinal, penetram nas células epiteliais maduras que revestem microvilosidades do intestino delgado, principalmente o jejuno, e posteriormente, pelo processo de replicação viral, atingem o íleo. Os mecanismos fisiopatológicos da gastroenterite associada aos adenovírus ainda não estão totalmente elucidados. Sustenta-se que o processo diarreico é de natureza osmótica, provocado pelo acúmulo de dissacarídeos no lúmen intestinal, daí resultando má absorção dos carboidratos (KAPIKIAN E CHANOCK, 2007).

3.1.9. Quadro clínico

Os sintomas clínicos das gastroenterites ou inflamações causadas por HAdV são caracterizadas por febre, vômito e diarreia (WOLD e ISON, 2013). Geralmente as infecções são autolimitadas, todavia, casos fatais já foram observados entre pacientes imunocomprometidos (GONÇALVES e DE VRIES, 2006).

A relação entre gastroenterites e HAdV manteve-se obscura por muito tempo na história, mas agora está bem definida. O período de incubação é relativamente longo se comparado àquele de outros enteropatógenos virais, variando de 3 a 10 dias (BLACKLOW e GREENBERG, 1991; LEBARON et al., 1990). Admite-se que o mecanismo básico de transmissão desses agentes virais ocorra de pessoa a pessoa, via fecal-oral, instalando-se em células epiteliais do trato gastrointestinal, considerando-se, ainda, que o trato respiratório possa constituir-se numa fonte de infecção (ALBERT, 1986; BLACKLOW e GREENBERG, 1991).

Os HAdV podem causar infecções persistentes, caracterizadas pela excreção fecal prolongada e intermitente, principalmente em relação à presença de HAdE (CARTER, 2005). Estão presentes principalmente em crianças menores de dois anos, podendo ficar latentes por meses, sendo assim responsáveis por propagação endêmica pela via fecal-oral, disseminando-se entre as crianças susceptíveis (KIM, 2009). Esta latência viral pode resultar em imunidade nos portadores, sem causar sintomas clínicos particulares. Este fato pôde ser comprovado através de estudo durante um surto em Houston, no qual se registrou 38% de positividade entre 249 crianças testadas, sendo que 46% destas eram assintomáticas, demonstrando que mesmo durante surtos epidêmicos de adenovírus muitas crianças infectadas não desenvolvem gastroenterite (WOLD e ISON, 2013).

As gastroenterites causadas por HAdE apresentam uma evolução prolongada, com duração de 5 a 12 dias, ocorrendo diarreia aquosa, vômitos, hipertermia moderada e desidratação leve. São usualmente de gravidade moderada, embora um caso de óbito já tenha sido relatado (WHITELAW et al., 1977). Os HAdE acometem indivíduos menores de dois anos de idade, principalmente ao longo do seu primeiro ano de vida. Crianças em faixas etárias mais elevadas e adultos podem também ser infectados com ou sem sintomatologia (KOTLOFF et al., 1989).

Um dos fatores relevantes para o estudo do HAdV refere-se ao fato deste patógeno possivelmente se associar a aproximadamente 50% dos casos de intussuscepção intestinal (IS) pediátrica, provavelmente precipitada pela hipertrofia das placas de Peyer, o que atuaria como "ponto de partida" para a obstrução. Como sinais e sintomas da IS, há início abrupto com dor devido cólica violenta (90%), vômitos (85%), massa abdominal (60%) e fezes sanguinolentas com consistência de/ou com formato de em "geleia de groselha" (60%). A localização mais comum é ileocólica (75-95%), seguindo-se a ileoileal (4%) e a colóclica. Como possíveis

complicações tem-se comprometimento vascular secundário (hemorragia, infarto, inflamação aguda) (GINELLI et al., 2011).

Manifestações respiratórias também aparecem com certa frequência. Em adultos sob condições normais de saneamento, as infecções por HAdV têm caráter esporádico, sendo responsáveis por cerca de 1 a 3% dos casos de resfriado. Esta situação se altera quando os indivíduos são alojados em habitações coletivas (quartéis, internatos, etc). A infecção assume então caráter epidêmico (DIETRICH, 1979).

Os AdNE multiplicam-se no epitélio das vias respiratórias superiores, na conjuntiva e no epitélio da mucosa intestinal. Os quadros clínicos envolvem faringite, rinite, traqueobronquite, via de regra acompanhados de conjuntivite (febre faringoconjuntival). Os tipos 3 e 7 (e outros) determinam principalmente quadros de conjuntivite folicular típica. A infecção nas vias respiratórias pode agravar-se, resultando em pneumonia viral. O tipo 8, entre outros, é o agente causal de uma ceratoconjuntivite dolorosa e epidêmica. Pode determinar a turvação da córnea (DIETRICH, 1979). As síndromes pulmonares observadas envolvem necrose brônquica, bronquite, pneumonia intersticial, assim como presença de fibrinas e membrana hialina dentro dos alvéolos (DUGGING et al., 1972). Também ocorrem lesões dentro da conjuntiva, onde são encontrados exsudatos e infiltrados mononucleares (JAWETZ et al. 1994).

A detecção do genoma viral de HAdV foi descrita em casos de miocardite, morte súbita infantil, síndrome do “choque tóxico-*like*” e morte “não explicada”; isto, além da associação a quadros de displasia broncopulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os HAdV também já foram isolados do sistema nervoso central de pacientes com paralisia flácida aguda e encefalite. Podem ainda causar infecções persistentes em pacientes imunocomprometidos (FERREIRA et al, 2014).

3.1.10. Imunidade

A imunidade mediada por anticorpos (Ac) é sorotipo-específica, sendo importante na resolução das infecções líticas e proteção contra reinfecção por um mesmo sorotipo. Ac tipo-específicos contra a fibra inibem a sua adsorção aos receptores celulares (ENGLER e HONG, 2007). Os Ac neutralizantes, inibidores da hemaglutinação e fixadores do complemento aparecem sete dias após o surgimento

dos sintomas e atingem concentração máxima em duas a três semanas. Os Ac fixadores do complemento persistem por seis a doze meses após a infecção, enquanto os neutralizantes e inibidores da hemaglutinação permanecem por oito a dez anos. A imunidade celular é importante para limitar a produção viral, como evidenciado pela presença de doença recorrente em pacientes imunocomprometidos (WORLD e ISON, 2013).

A importância da imunidade celular na infecção por esses agentes encontra-se sob análise. Estudos demonstram que várias citocinas, tais como IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , são secretadas por leucócitos infectados pelos HAdV ou células de murinos infectadas com HAdV da espécie C, ainda que a função que elas desempenham na patogênese e no controle da doença permaneçam indefinidos (GINGSBERG et al., 1991; KAJON et al., 2003).

3.1.11. Diagnóstico

As manifestações clínicas da doença causada pelos HAdV não são suficientes para permitir o diagnóstico, uma vez que outros enteropatógenos podem provocar quadros clínicos semelhantes, daí a necessidade da realização de um diagnóstico diferencial com exames laboratoriais específicos para sua confirmação.

O diagnóstico laboratorial para HAdV visa à detecção de antígenos ou ácidos nucleicos em amostras clínicas, coletadas em sítios anatômicos específicos da infecção. Neste caso, faz-se necessário observar o período agudo de excreção viral. Para detecção de HAdV em fezes, este período pode ser de três a cinco dias para os pacientes com febre, de 3 a 6 semanas para aqueles com sintomas generalizados ou até de 2 a 12 meses para os pacientes imunocomprometidos. No entanto, mesmo após o período de infecção aguda, ainda é possível detectar por meses ou anos a presença de HAdV latente em alguns tecidos ou fezes. As amostras necessitam ser imediatamente processadas e, caso não seja possível, devem ser congeladas a temperatura de -70°C (WORLD e ISON, 2013)

Os HAdV podem ser detectados em uma grande variedade de espécimes biológicos como aspirados de nasofaringe, *swab* de garganta, nariz e conjuntiva, líquido cefalorraquidiano, sangue, urina, fezes e, ainda, biópsias. O tipo de espécime é indicado de acordo com o quadro clínico (WORLD e ISON, 2013).

A microscopia eletrônica (ME) foi a primeira técnica utilizada com propósito de detectar partículas virais em seções do epitélio intestinal (Figura 8). Essa técnica apresenta boa sensibilidade, sendo de rápida execução. Não obstante, possui alto custo e requer técnicos qualificados, o que limita seu uso em larga escala. Tem sido utilizada em situações específicas para uma identificação rápida e, sobretudo, para identificar em amostras fecais os HAdEs, que não são cultiváveis facilmente (WOLD e ISON, 2013).

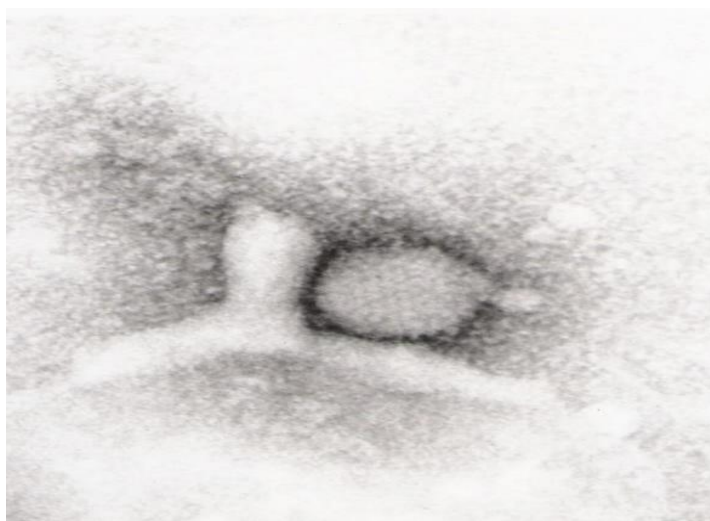


Figura 8: Micrografia eletrônica de partícula viral de adenovírus (X40.000) do Projeto de Vigilância Hospitalar e Ambulatorial. **Fonte:** Seção de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

O diagnóstico de AdNE é frequentemente baseado no isolamento viral em linhagens celulares como A549 (carcinoma de pulmão humano), HeLa (carcinoma de colo de útero humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humano), entre outras (SANTOS E SOARES, 2008). As linhagens celulares suscetíveis aos adenovírus mostram efeito citopatogênico típico (Figura 9). Estes efeitos consistem em arredondamento (formato “baloniforme”), formação de agrupamentos celulares e edema mitocondrial das células infectadas (KASEL, 1979). O cultivo celular, além de promover o isolamento viral, apresenta a vantagem de aumentar a quantidade de partículas virais para posterior caracterização (RUUSKANEM et al., 1997).

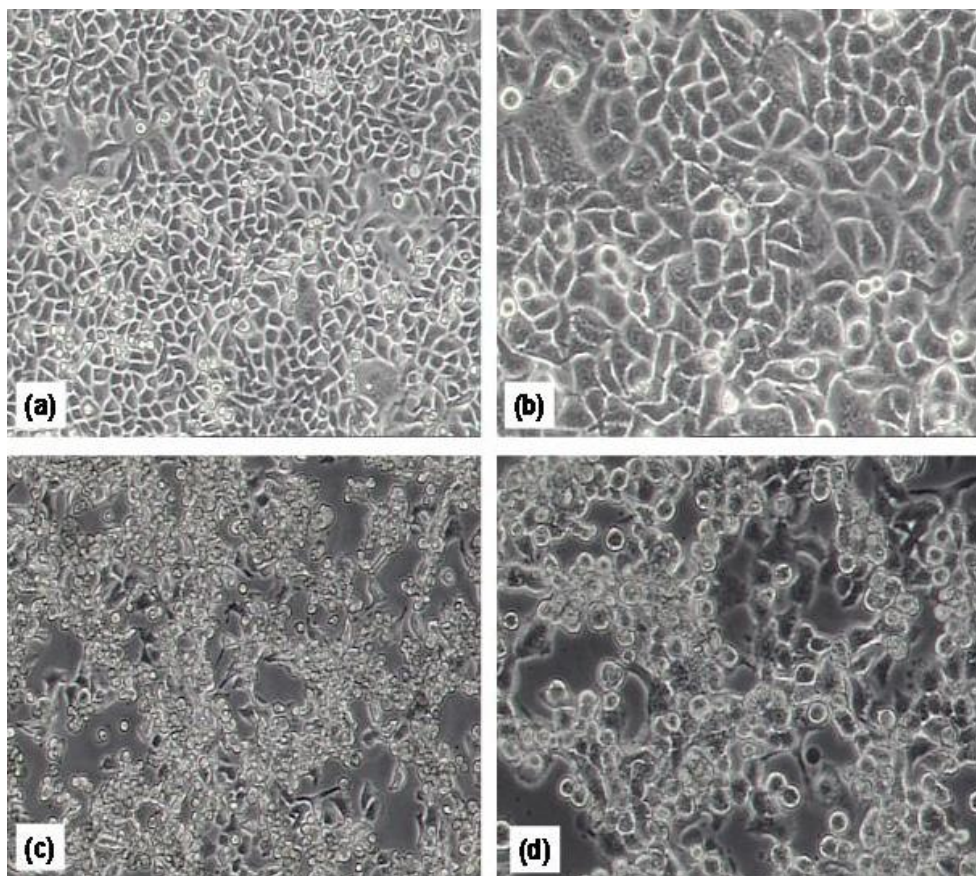


Figura 9: Efeito citopatogênico (ECP). (a) e (b) Monocamada normal de células HEp-2 em objetivas de 5x e 10x, respectivamente. (c) e (d) Efeito citopatogênico de adenovírus não- entérico. Observa-se a formação de agrupamentos entre as células, o arredondamento e o destacamento das mesmas, objetivas de 5x e 10x respectivamente. Figuras observadas em microscopia óptica. **Fonte:** Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas.

O vírus isolado pode ser posteriormente identificado por imunofluorescência (IF), ensaio imunoenzimático (EIE) ou teste de neutralização (TN). O diagnóstico pode ser realizado por detecção direta do antígeno (Ag) viral na amostra clínica, por métodos como EIE e IF (SANTOS e SOARES, 2015). Também existem os testes de fixação do complemento (FC) e imunocromatografia (IC), os quais utilizam Ag e Ac padrão-específicos, o que permite a identificação para todas as amostras isoladas de origem humana. Testes de inibição da hemaglutinação (IH) e soroneutralização (SN) permitem identificar adenovírus tipo-específico e distinguir membros de cada grupo (WOLD E HORWITZ, 2007).

O “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou para a triagem laboratorial alguns kits comerciais de EIE, tais como o Ridascreen® ou Adenoclone® (Meridian, Bioscience) para a detecção direta em amostras oculares ou espécimes fecais. Estes testes detectam a maioria dos HAdV em cerca de 1 hora e podem ser

realizados em ambientes ambulatoriais. No entanto, necessitam de elevada concentração viral, com sintomas clínicos de 1 a 3 dias (WOLD e ISON, 2013).

O teste de imunocromatografia (IC) se baseia na detecção qualitativa de antígenos virais em amostras de fezes. Essa técnica é de rápida execução e possui sensibilidade e especificidade comparável à do EIE (MÜLLER et al., 2005).

Técnicas da biologia molecular, como hibridização *in situ*, digestão do DNA viral com endonucleases de restrição e a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) têm sido utilizadas tanto visando à identificação de subgênero/sorotipo, quanto para identificação do genoma viral (LOGAN e O'LEARY, 2006). O produto da amplificação pode ser visualizado pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) ou agarose (EGA) (HUSSAIN e COSTELLO, 1996).

As técnicas moleculares apresentam grande vantagem frente aos ensaios que envolvem o cultivo celular. Dentre estas podemos relacionar a agilidade na obtenção dos resultados, elevadas sensibilidade e especificidade, desde que realizadas adequadamente. Devem-se considerar também para diagnóstico molecular as variações da PCR convencional, tais como a nested-PCR, multiplex PCR e PCR em tempo real. A semi-nested PCR e a nested-PCR aumentam a sensibilidade e a especificidade da PCR pela utilização de um ou dois iniciadores “primers” internos, respectivamente. No entanto, um aumento no risco de contaminação tem sido observado nestas técnicas durante a transferência do produto da primeira para a segunda reação de PCR (FONG e LIPP, 2005).

A PCR em tempo real assume maior importância entre a população de pacientes imunocomprometidos, na qual é possível simultaneamente identificar o sorotipo envolvido e determinar a carga viral (SANTOS E SOARES, 2008). O teste utiliza os mesmos reagentes da PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA (metodologia *SybrGreen*) ou presentes em sondas de hibridização específicas (metodologia *TaqMan*). A fluorescência emitida é mensurada em tempo real à medida que os produtos são gerados no decorrer da reação. Neste caso, o monitoramento do ensaio ocorre durante todo o processo de produção de *amplicons* e a cada ciclo da PCR. Uma curva vai sendo gerada de acordo com a concentração do produto sintetizado e em função do número de ciclos (PEREIRA e MACIEL, 2004).

A genotipagem dos HAdV pode ser feita por métodos como sequenciamento de nucleotídeos. A região do genoma que codifica o hexon é altamente conservada

e foi a escolhida por Allard et al. (2001) para nortear o desenho dos iniciadores para a identificação dos sorotipos das espécies.

3.1.12. Tratamento

Considerando que a maioria das infecções por adenovírus é assintomática, geralmente não há necessidade da administração de drogas antivirais para tratá-los (LEEN e BOLLARD, 2006). Já nos casos dos pacientes imunocomprometidos, há grande interesse no desenvolvimento de drogas antivirais (KINCHINGTON e ROMANOWSKI, 2005).

Uma classe de drogas denominada nucleosídeos acíclicos fosfonatos tem sido efetiva contra muitos vírus de DNA, incluindo os adenovírus. Um destes, conhecido como cidofovir, tem sido estudado extensivamente no tratamento das infecções por estes vírus. O cidofovir pode funcionar como um inibidor da DNA polimerase, sendo o seu trifosfato um substrato para a polimerase, agindo por uma variedade de mecanismos e inibindo a síntese final da cadeia do DNA. Este medicamento também se mostrou um potente inibidor da replicação de HAdV em culturas celulares (DE CLERCQ, 2011; HOSTELER, 2009).

Além do cidofovir, outros antivirais como ribarivina e ganciclovir têm sido utilizados experimentalmente no tratamento das infecções por HAdV, mas nenhum deles apresentou resultados que conduzissem a liberação para uso pela FDA (SANTOS e SOARES, 2015).

O tratamento das infecções por adenovírus é o mesmo aplicado aos outros casos de gastroenterite viral. Por ser uma doença autolimitada e de manejo relativamente simples, a correta identificação do tratamento hidroeletrolítico necessário e a manutenção da dieta habitual da criança poderão evitar mortes e reduzir as chances de mortalidade pela doença enquanto se aguarda que a melhoria das condições socioeconômicas das populações possa diminuir a incidência e gravidade da diarreia infantil (MISODOR, 2008).

Em alguns países, a terapia de reidratação oral (TRO) foi capaz de reduzir em aproximadamente 75% das mortes infantis e 61% das hospitalizações por diarreia entre 1980 e 2008 (SANTOSHAM et al, 2010). No Brasil, com a disseminação do uso da TRO (medida de baixo custo e eficácia comprovada), o perfil de mortalidade por diarreia sofreu modificação significativa. A reposição hidroeletrolítica,

principalmente por via oral, apresenta-se como recurso terapêutico amplamente usado nos quadros de gastroenterites, tendo determinado um sensível declínio nos índices de morbimortalidade (AAP, 1998). O tratamento por via parenteral é usado em situações de maior gravidade, justificando a necessidade da reposição imediata de eletrólitos, devido à diarreia e vômito (BRASIL, 2008).

3.1.13. Vacinas

Como resultado de um significativo aumento de infecção por HAdV na população militar dos EUA nos anos 60, o *National Institutes of Health* (NIH) e o laboratório Wyeth-Lederle® desenvolveram e disponibilizaram uma vacina oral e entérica, efetiva para os sorotipos HAdV 4 e HAdV 7, a qual protege contra infecções respiratórias causadas por HAdV (LYONS et al, 2008). Está disponível para militares e não para a população civil em geral. Também não é administrada em crianças suscetíveis (GAYDOS e GAYDOS, 1995). Nesta vacina, os sorotipos são “empacotados” em cápsulas entéricas, as quais atravessam o epitélio gastrintestinal, ocorrendo a replicação viral apenas ao alcançar o intestino. A infecção entérica é assintomática e resulta em resposta imune satisfatória em termos de Ac neutralizantes (COUCH et al., 1963).

Em 1996, a fabricação da vacina cessou e diversos surtos de IRA por HAdV ocorreram em instalações militares (BARRAZA et al., 1999). Devido a esta reemergência, a vacina foi novamente desenvolvida e implantada pelo Laboratório Wyeth-Lederle®. Os genomas das vacinas Ad4 e Ad7 foram sequenciados, anotados e comparados com os protótipos HAdV 4 e HAdV 7. Observou-se que o ITR da vacina do HAdV 4 era idêntico à espécie C dos adenovírus, enquanto que o ITR do protótipo HAdV 7 era idêntico à espécie B1 dos adenovírus. Curiosamente, tanto o HAdV 4 como o HAdV 7 parecem não ter as mudanças de bases que sugeriram um fenótipo atenuado nas análises de bioinformática (PURKAYASTHA et al., 2005).

Em março de 2011 foi novamente aprovada uma vacina oral e entérica, efetiva contra os sorotipos HAdV 4 e HAdV 7 e disponível a população militar de 17 a 50 anos de idade. A infecção entérica causada pela vacina é normalmente assintomática e resulta em resposta imune satisfatória em termos de Ac neutralizantes. No entanto, efeitos adversos relacionados a esta vacina incluem

hematúria, gastroenterite, febre, gastrite e pneumonia. A efetividade da vacina é de 94,5% e 93,8% frente às infecções por HAdV 4 e HAdV 7, respectivamente (LYONS et al, 2008).

A vacina não é administrada em crianças ou população civil por causa dos riscos de transmissão pelos sintomas clínicos, desenvolvidos por indivíduos vacinados. Também é possível contaminação pelo vírus não atenuado em adultos pelo contato sexual (PURKAYASTHA et al., 2005).

Atualmente, está em estudo uma vacina contra os sorotipos Ad1, Ad2 e Ad5 que induza resposta imune no epitélio intestinal, faringe e soroconversão em termos de Ac humorais. No entanto, sem maiores efeitos clínicos (WOLD e ISON, 2013). Até o momento, não existe uma vacina contra a infecção entérica por HAdV (SANTOS e SOARES, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes clínicos obtidos para o presente estudo foram coletados na cidade de Belém, Pará, Brasil, localizada na Amazônia oriental, confluência dos rios Pará e Guamá. O clima é tropical e úmido, apresentando níveis pluviométricos elevados no período de fevereiro a abril. A estimativa da população é de 1.437.600 habitantes, ocupando uma área de 1.065 Km² (IBGE, 2010).

4.2. CASUÍSTICA

Foram analisadas 842 amostras fecais de crianças originalmente participantes de um estudo caso-controle para avaliar a efetividade da vacina Rotarix® na prevenção de gastroenterite grave por RV. Este estudo foi do tipo observacional, transversal, com abordagem descritiva e analítica.

Os critérios de inclusão dos espécimes clínicos a serem testados quanto a presença de HAdV eram: crianças hospitalizadas com quadro de gastroenterite aguda, nascidas após 6 de março de 2006 e com pelo menos 12 semanas de idade, as quais tenham sido vacinadas contra RV na rede pública de saúde.

Conduziu-se tal investigação no período de maio de 2008 a abril de 2011, quando se coletaram cerca de 8.000 espécimes fecais de crianças na faixa etária de 3 meses a 3 anos, internadas em dois hospitais pediátricos de Belém, Pará. As coletas nesses hospitais foram realizadas diariamente. Para este estudo sobre HAdV foram selecionadas 842 amostras (Tabela 1) obtidas no período de maio de 2009 a abril de 2010 (Ano II do estudo original) e de abril de 2010 a maio de 2011 (Ano III), utilizando como critério o “sorteio aleatório” do programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2008). Com base nas taxas relativas à ocorrência de adenovírus no âmbito hospitalar em estudos no Brasil (14%), estimou-se o tamanho mínimo da amostra em 374, considerando erro amostral máximo de 5% e valendo-se do programa preconizado por Santos et al. (2016).

Projeto Rotavírus Caso Controle					
Amostras coletadas	Clínica Pediátrica	Selecionadas Teste HAdV	Clínica Pio XII	Selecionadas Teste HAdV	Total Testadas
Ano II	1076	227	1048	221	448
Ano III	798	169	1063	225	394
Total	1874	396	2111	446	842

Tabela 1: Esquema representativo do projeto de pesquisa e respectivas quantidades de espécimes selecionados para pesquisa de Adenovírus no presente estudo.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O presente estudo não ofereceu riscos ou prejuízos aos pacientes, uma vez que todas as amostras já foram coletadas e não houve contato com os mesmos. Em relação aos benefícios, essa investigação proporcionará melhor compreensão acerca da ocorrência de HAdV de origem humana na cidade de Belém, Pará, com ênfase para os caracterizados como entéricos. Daí podem advir medidas relacionadas ao tratamento, controle e prevenção.

A presente investigação foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do IEC sob número do parecer de aprovação 0034/2011 (CAAE: 0013.0.72.000-11), em observância às normas nacionais e internacionais que regulamentam tal atividade (Anexo A).

No que se refere aos aspectos da biossegurança, em todos os procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e o material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de fluxo laminar tipo 2.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste estudo foram organizados em gráficos nos programas Microsoft Office Excel 2010 e Harvard Graphics 98. As medidas de frequência dos dados epidemiológicos (gênero, idade e sazonalidade) foram analisadas utilizando o Programa BioEstat 5.0, aplicando o teste estatístico do Qui-Quadrado (χ^2) e de partição; e adotando o nível de significância naquelas amostras de grupos que apresentaram valores de p menores ou iguais a 5% ($p < 0,05$) (AYRES et al., 2008).

As medidas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VVP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia do método de IC foram testadas em comparação com o EIE utilizando o Programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2008).

4.5. TÉCNICAS EMPREGADAS (Figura 10):

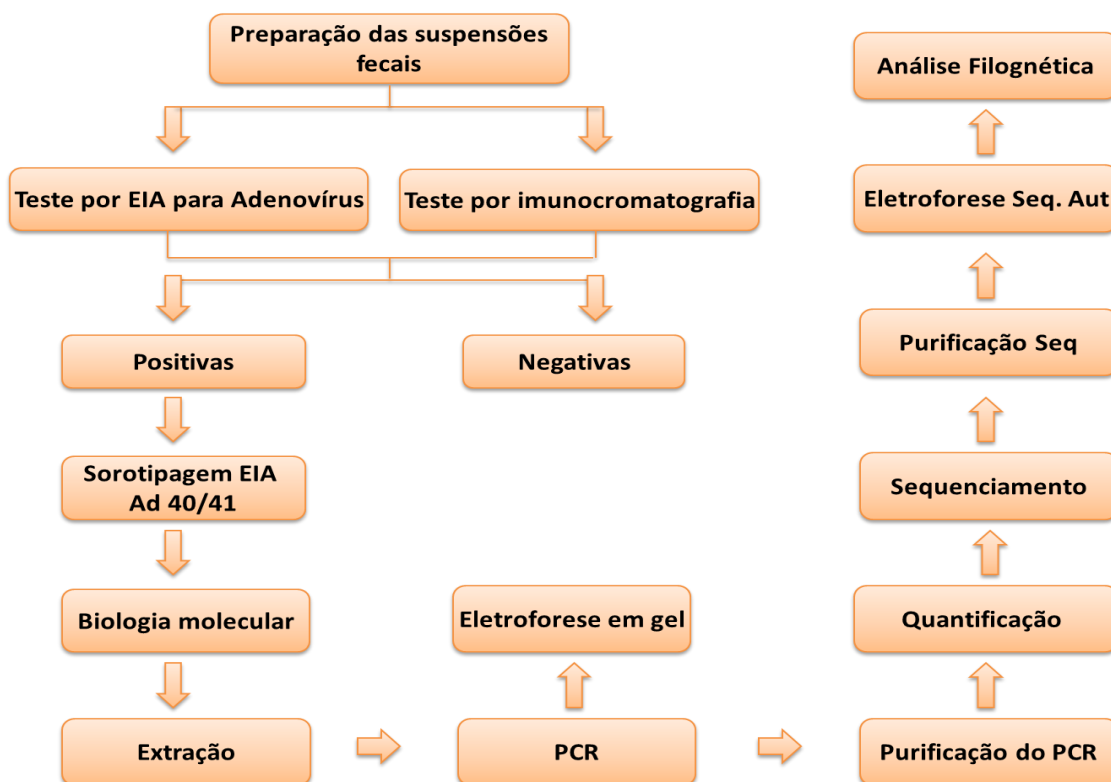


Figura 10: Algoritmo exibindo os procedimentos laboratoriais.

4.5.1. Ensaios imunoenzimáticos

Suspensões fecais a 10% (massa/volume) foram testadas pela técnica de EIE, utilizando-se método Ridascreen® Adenovírus, com o uso de “kits” fabricados pelo laboratório R-Biopharm (Darmstadt, Alemanha). O método utiliza anticorpos monoclonais em um processo tipo “sanduíche”. A superfície da cavidade da placa de vem sensibilizada com anticorpos monoclonais contra o antígeno *hexon* dos adenovírus.

Inicialmente foram preparadas as suspensões fecais com 1 ml do tampão de diluição do kit e cerca de 100µl da amostra. No caso das fezes sólidas, utilizou-se uma quantidade de aproximadamente 50 – 100 mg. A homogeneização da suspensão de fezes foi feita por agitação em vórtex. Após um período curto de

repouso para a sedimentação de partículas maiores de fezes, o sobrenadante foi utilizado diretamente no teste.

Cada orifício recebeu 100 μ L de suspensão fecal e 100 μ L do anticorpo conjugado com biotina (*Conjugate 1*). Foram utilizados controles positivo e negativo, e a placa foi incubada a temperatura ambiente. Após 1h foram realizadas cinco lavagens com água deionizada. Em seguida, procedeu-se nova incubação, desta vez adicionando-se 100 μ L do conjugado poli-estreptavidina (*Conjugate 2*) durante 30 minutos. Foram realizadas mais 5 lavagens e adicionados 100 μ l do substrato, incubando-se por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo a reação interrompida pela adição de 50 μ l de ácido sulfúrico. A leitura dos resultados foi realizada visualmente e, quantitativamente, com a utilização do espectrofotômetro (filtro A₄₅₀), conforme especificações do método (Figura 11).

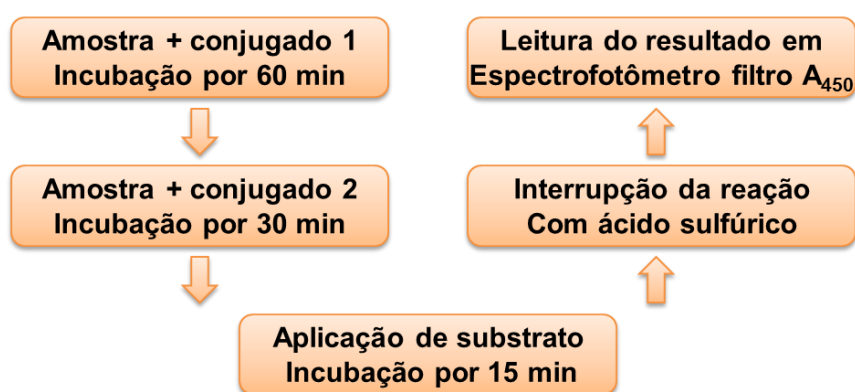


Figura 11: Esquema representando a metodologia do teste de EIE.

O valor de corte (“cut-off”) foi determinado como sendo aquele de absorbância do controle negativo acrescido de 0,15. Amostras com absorbância acima deste valor foram consideradas positivas, e as que apresentaram absorbância 10% acima, ou abaixo deste valor, foram submetidas a novo teste. Os espécimes que desenvolveram cor e uma absorbância duas vezes maior que a do controle negativo, porém menor que o valor do “cut-off”, foram considerados suspeitos.

Todas as amostras positivas obtidas pelo EIE foram sorotipadas para HAdE pelo método Premier Adenoclone[®] Type 40/41, proveniente do laboratório Meridian Bioscience (Ohio, EUA). Esta técnica tem o mesmo fundamento do EIE global, no entanto, consiste em detectar apenas os antígenos específicos da porção *hexon* de HAdE 40/41, com metodologia semelhante à anterior.

4.5.2. Ensaio imunocromatográfico

Todas as amostras selecionadas neste estudo foram retestadas pela técnica de imunocromatografia (IC). Para este ensaio foi utilizado o método “Rida[®]Quick”, do laboratório R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha). Este teste consistiu na utilização de fitas reativas contendo uma membrana de nitrocelulose, a qual possuía partículas de látex vermelhas (com Ac específicos para RV) ou azuis (com Ac específicos para HAdV).

Neste teste, a amostra de fezes foi suspensa a 10% no tampão de extração e então sedimentada. A tira do teste foi mergulhada no sobrenadante, sendo que este migrou então pela membrana com as partículas coloridas de látex, às quais em caso positivo o antígeno disponível se ligava especificamente às tiras de captação. Dependendo do antígeno presente na amostra, era então visível uma linha azul e/ou vermelha (Figura 12).

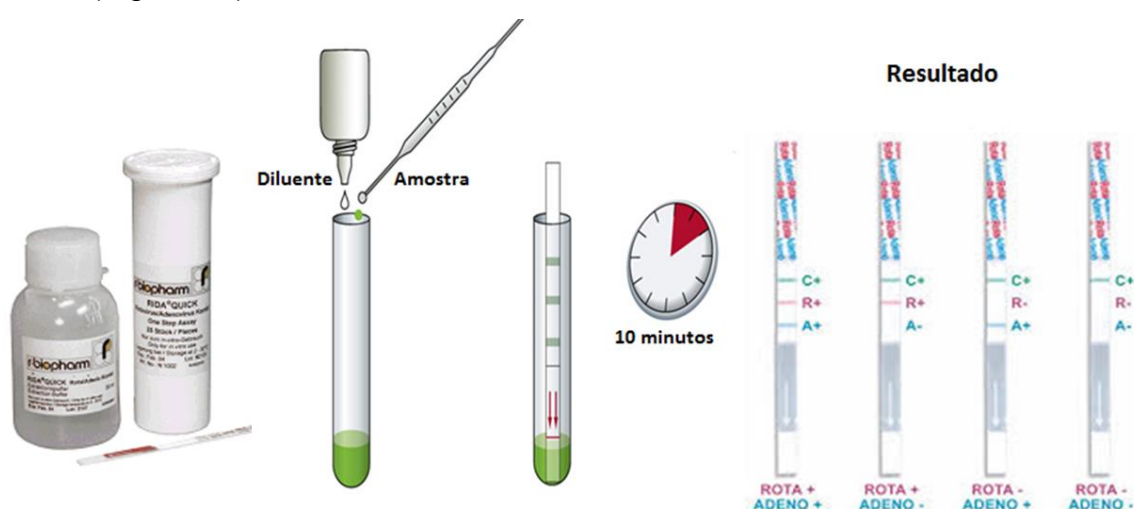


Figura 12: Esquema representando a metodologia do teste de Imunocromatografia (IC).

Fonte: adaptado de <http://www.corpodiagnostics.com>.

4.4.3. Técnicas de caracterização molecular

Os espécimes positivos pelo EIE e IC foram então submetidos à reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), conforme descrito nas etapas a seguir.

4.4.3.1. Extração do genoma viral

A extração do DNA viral foi feita utilizando-se o “kit” QIAamp® DNA Stool Mini kit, fabricado pelo laboratório QIAGEN (Valencia, EUA), que consiste na extração e purificação do DNA da amostra deixando-a livre de impurezas que possam causar dificuldades quando na reação de PCR. Para realizar a extração do material fecal utilizou-se o procedimento abaixo descrito.

Pesaram-se 180 a 220 mg da amostra em um tubo de 2 ml e adicionou-se 1,4 ml de tampão ASL no tubo, promovendo assim a quebra das partículas virais. Agitou-se em “vórtex” por 1 minuto e então foi feita uma incubação durante 5 minutos a 70°C. Em seguida agitou-se em “vórtex” por 15 segundos e centrifugou-se por 1 minuto. Retirou-se 1,2 ml do sobrenadante, o qual foi colocado em um tubo novo de 2 ml.

Adicionou-se um tablete de “inhibitex” e agitou-se em vortex por 1 minuto. Em seguida foi realizada uma incubação por 1 minuto a temperatura ambiente para permitir a inibição e absorção do “inhibitex matrix”, o qual promoveu a digestão das proteínas. Após esse período, centrifugou-se por 3 minutos e o sobrenadante foi colocado em um novo tubo de 1,5 ml e centrifugou-se por mais 3 minutos. Foram pipetados 15 µl de Proteinase K em um novo tubo de 1,5ml ao qual foram adicionados 200 µl do sobrenadante e 200 µl de tampão AL e foi feita uma incubação a 70°C durante 10 minutos. Em seguida foram acrescentados 200 µl de etanol e o tubo foi agitado em “vórtex”. Este conteúdo foi adicionado à coluna e centrifugou-se por 1 minuto. Em um novo tubo foram adicionados 500 µl de tampão AW1 (na coluna) e centrifugou-se por 1 minuto. Em outro tubo contendo a mesma coluna foram colocados 500µl do tampão AW12 e centrifugou-se por 3 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e foram adicionados 200 µl do tampão AE diretamente na membrana. Foi feita uma incubação por 1 minuto a temperatura ambiente e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto para extrair o DNA; sendo este armazenado a – 20°C.

4.4.3.2. Reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR)

A reação ocorreu com o uso dos “iniciadores” de 301 pares de bases (pb) hex1deg (5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3') e hex2deg (5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'), descritos por Allard et al. (2001).

Foi utilizada a seguinte metodologia para a PCR: incubaram-se 10 µl do DNA viral a 94°C por 5 minutos, resfriou-se em banho de gelo durante 2 minutos, e adicionaram-se 20 µl da mistura cujos reagentes estão descritos na Figura 13. A reação foi realizada em termociclador automático, conforme condições descritas na Figura 14.

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água DNase/RNase free	12,2
dNTP (20µM)	2
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ (50mM)	1
Iniciador Hex1Deg (0,5 µM)	1
Iniciador Hex2Deg (0,5 µM)	1
Taq polimerase (5 U/µL)	0.3
Volume final	20

Figura 13: Reagentes e respectivos volumes utilizados na PCR.

Etapa da Reação	Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
Desnaturação	1 X	94	300
Desnaturação	35 X	91	40
Anelamento		40	30
Extensão		72	40
Extensão final	1 X	72	600
	1 X	-10	∞

Figura 14: Condições de termociclagem utilizadas na PCR.

O produto de amplificação da PCR foi analisado por eletroforese horizontal (120 volts por 35 minutos) em gel de agarose a 1,5%, corado previamente em “sybr safe®”, utilizando tampão TBE 1X pH 8,4. A visualização dos “amplicons” foi efetuada em aparelho de foto-documentação Gel-Doc 1000® (Vilber Lourmat, França) em sistema de captura de imagem “Biocapt”. Utilizou-se como padrão um peso molecular de 123 pares de base (pb).

4.4.3.3 Purificação do produto da PCR

O produto obtido na PCR foi encaminhado para um processo de purificação, objetivando o posterior sequenciamento de nucleotídeos. Utilizou-se o kit disponível comercialmente denominado QIAQuick PCR purification (QIAGEN®), selecionados segundo os parâmetros para purificação, diretamente do produto da PCR e segundo o protocolo descrito.

Em um primeiro momento, adicionou-se 5 vezes o volume do tampão PB para cada volume de PCR usado. Após homogeneização, a mistura foi transferida para a coluna acoplada ao tubo coletor de 2 mL, a qual foi centrifugada (10.000 Xg) por um minuto. O sobrenadante foi descartado e a coluna novamente acoplada ao tubo. Adicionaram-se 750 µL do tampão PE diluído a coluna e este produto foi centrifugado por um minuto para lavagem.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado novamente para remoção dos resíduos de reagentes e a coluna centrifugada por 60 segundos sem adição de qualquer outro reagente. Posteriormente, a coluna foi transferida a um tubo coletor e o DNA eluído em 50 µL do Tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5). O material foi incubado a TA por um minuto e, logo após, centrifugado por um minuto para coleta e armazenamento do produto final a -20°C para ser quantificado e usado na reação de sequenciamento.

4.4.3.4 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA para a determinação da concentração do mesmo foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante com o uso do marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen). O DNA purificado foi aplicado em gel de agarose a 1,5% corado com “Sybr Safe®” em TBE a 1X, sendo aplicado também em outro orifício o peso molecular (Low Mass Ladder). Após eletroforese horizontal, as bandas de interesse no gel foram comparadas com o peso molecular, segundo a intensidade da banda, e a concentração do DNA foi expressa em nanogramas (ng), a qual serviu de parâmetro para a reação de sequenciamento.

4.4.3.5 Reação de sequenciamento de nucleotídeos

Foram utilizados os “iniciadores” hex1deg (5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3') e hex2deg (5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'), descritos por

Allard et al. (2001) para caracterização das espécies e identificação dos diversos tipos de HAdV.

A reação de sequenciamento foi conduzida segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), utilizando-se a mistura da reação conforme se observa na Figura 15. A mistura foi colocada no termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (hibridização) e 60°C por 3 minutos (extensão).

Reagentes	1X/ μ L
Iniciador (0,5 μ M)	2
Tampão 5X	2
Big Dye Terminator	2
DNA	Depende da concentração (máximo 4 μ L)
H ₂ O	Depende da quantidade de DNA (máximo 3 μ L)
Total	10

Figura 15: Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes

4.4.3.6. Purificação do produto da reação de sequenciamento

O produto dessa reação foi purificado por precipitação com isopropanol, com a finalidade de retirar o excesso de terminadores não incorporados na reação de sequenciamento. Após a precipitação, o produto foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em aparelho Speedvac (Eppendorf) a 60°C por 15 minutos. A seguir, os produtos foram armazenados a 20°C, protegidos da luz para posterior eletroforese.

4.4.3.7. Eletroforese em sequenciador automático

As amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida, transferidas para uma placa de 96 orifícios e desnaturadas a 96°C por 5 minutos em termociclador e colocadas em banho de gelo a 0°C por 3 minutos. Em seguida, a placa foi colocada no sequenciador automático ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems), para a realização da eletroforese e obtenção das sequências.

4.4.3.8. Alinhamento e edição das sequências para construção da árvore filogenética

Após o término da eletroforese, foram obtidas as sequências dos genes, os quais foram alinhados e editados no programa Bioedit (v. 6.05), obtendo-se uma sequência consenso para cada amostra. Em seguida, foi realizada uma pesquisa no banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) no programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para comparar as sequências de adenovírus. As árvores filogenéticas foram construídas, a partir das sequências alinhadas obtidas, em programa Mega 5.0 (Análise Weighbor-joining) com boodstrap de 2.500 réplicas.

5. RESULTADOS

5.1. PREVALÊNCIA DE ADENOVÍRUS

Dentre as 842 amostras testadas para HAdV por EIE e IC, obteve-se uma positividade de 7,2% (61/842). A sorotipagem por EIE para HAdV 40/41 demonstrou que os HAdE foram encontrados em 3,7% (31/842) do total de espécimes, correspondendo a 50,8% (31/61) das amostras positivas, e os AdNE estavam presentes em 49,2% (30/61) delas (Figura 16).

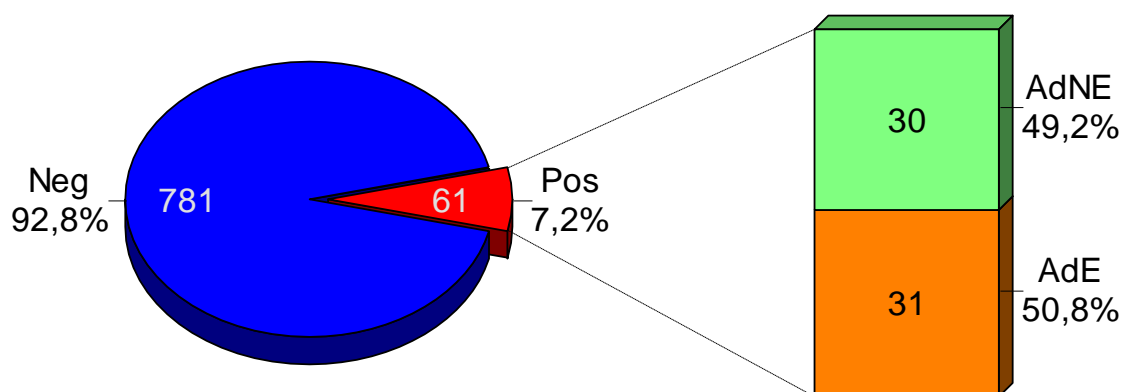


Figura 16: Prevalência de adenovírus em 842 espécimes fecais de crianças com gastroenterite obtidas após a introdução da vacina contra rotavírus no Brasil, coletadas no período de maio de 2009 a abril de 2011, em Belém, PA.

5.2. CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Todas as amostras foram testadas tanto pelo EIE como pela técnica de IC. Dessas, 5,6% (47/842) foram positivas por ambas as metodologias, 11 espécimes foram positivos apenas por EIA e 3 apenas por IC (Tabela 2).

A avaliação do método de IC frente ao EIE utilizado como referencial demonstrou sensibilidade de 84% $[58/(58+11)]$ e especificidade de 99,6% $[781/(3+781)]$. O valor preditivo positivo (VPP) obtido foi de 0,95 ou 95% $[58/(58+3)]$, enquanto que o valor preditivo negativo (VPN) foi de 0,98 ou 98,6% $[781/(781+11)]$; e a acurácia foi de 0,98 ou 98,3% $[(47+781)/(58+3+781)]$.

Técnicas			
EIE	Imunocromatografia		Total
	Positivas	Negativas	
Positivas	47	11	58
Negativas	3	781	784
Total	50	792	842

Tabela 2: Resultados dos testes para HAdV obtidos por EIE e IC em 842 amostras fecais de crianças hospitalizadas com gastroenterite coletadas em Belém, PA, no período de maio de 2009 a abril de 2011.

5.3. CASOS DE COINFECÇÃO ENVOLVENDO ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS

Em relação à análise de amostras indicativas de coinfeção por HAdV e RV, foram detectados 2 casos, correspondendo a 0,23% (2/842) do total de espécimes fecais testados; ou 3,3% (2/61) dentre as amostras positivas. Um caso foi identificado no ano II do estudo, período de maio de 2009 a abril de 2010; e outro caso no ano III, período de maio de 2010 a abril de 2011.

5.4. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES PEDIÁTRICAS POR ADENOVÍRUS

Na análise quanto ao gênero das crianças infectadas foi observada maior prevalência de infecção por HAdV entre as crianças do sexo feminino, com 7,7% (28/362); quando comparado ao sexo masculino, 6,9% (33/480) foram positivas (Figura 17). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à prevalência ($p=0,7334$) em relação a esta variável analisada.

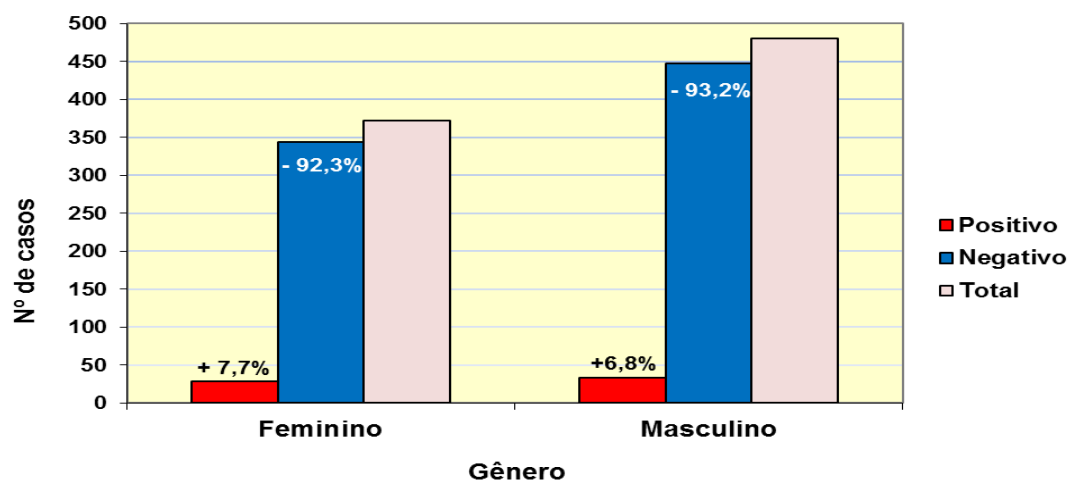


Figura 17: Distribuição dos adenovírus por gênero dentre as 842 crianças hospitalizadas participantes de um estudo durante o período de maio de 2009 a abril de 2011, após a implantação da vacina oral contra rotavírus humano (VORH) no Brasil.

Em relação à análise de positividade por faixa etária dos pacientes infectados por HAdV, observou-se maior prevalência entre as crianças com mais de 24 meses de idade, correspondendo a 9% (16/178) do total de casos positivos, seguidas pelas idades entre 6 a 12 meses com 8% (9/113), e 12 a 18 meses com 7,6% (22/289) do total de amostras testadas (Figura 18).

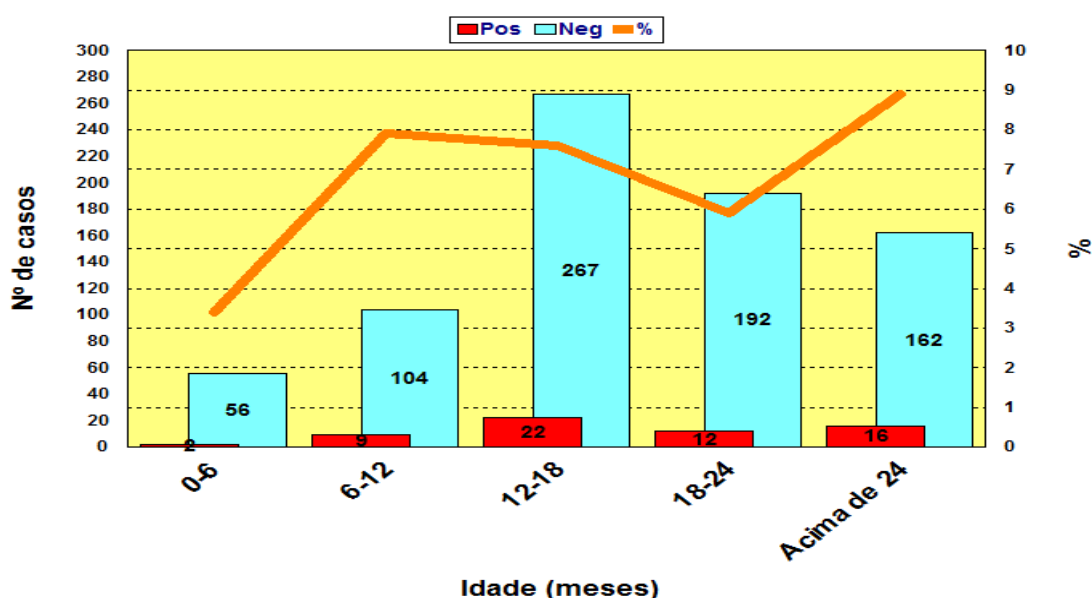


Figura 18: Frequência dos adenovírus de acordo com a faixa etária das 842 crianças hospitalizadas participantes de um estudo pós-vacinação contra rotavírus. Número de amostras positivas, negativas e percentuais por idade.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à variável de idade entre as crianças infectadas por HAdV após a vacinação contra RV, conforme se observa na Tabela 3.

Faixa Etária	Adenovírus / Total	P valor – Teste χ^2
0 a 6 meses	3,4% (2/58)	0,8884
6 - 12 meses	8% (9/113)	0,2739
12 - 18 meses	7,6% (22/289)	0,8330
18 – 24 meses	5,9% (12/204)	0,5040
Acima de 24 meses	9% (16/178)	0,3954
Total	7,2% (61/842)	0,8756

Tabela 3: Frequência de adenovírus de acordo com a faixa etária das crianças. Amostras coletadas no período de maio de 2009 a abril de 2011, em Belém, Pará.

5.5 AVALIAÇÃO DA TEMPORALIDADE E SAZONALIDADE DAS INFECÇÕES

Quanto à distribuição temporal dos HAdV (Figura 19), o mês de junho foi o de maior prevalência, com 11,4% (8/70) do total de casos positivos, abrangendo os dois anos do estudo (Ano II e Ano III). No entanto, a avaliação individual de cada ano do estudo demonstrou maior prevalência nos meses de agosto de 2009, com 16,2% (6/37) e março de 2010, com 16% (4/25) dos casos positivos, seguidos pelos meses de dezembro de 2009, com 14,8% (4/27) e junho de 2009, com 14,6% (6/41). Esta pequena diferença de positividade, observada ao longo dos meses de condução do estudo não foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

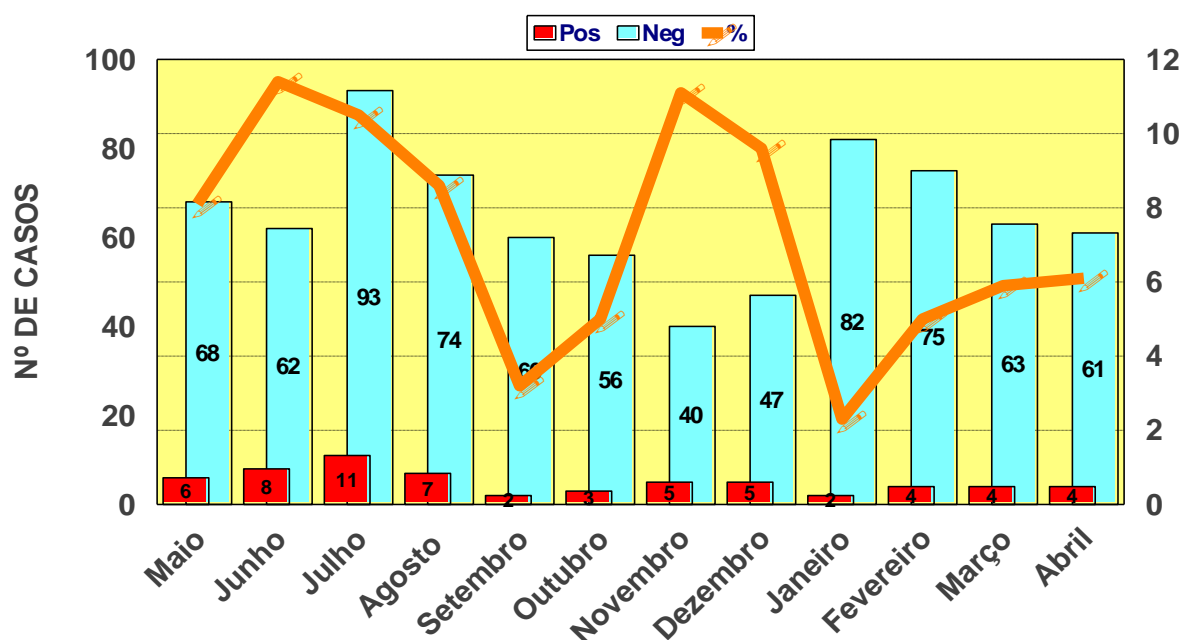


Figura 19: Distribuição mensal dos adenovírus detectados em 842 espécimes fecais provenientes de estudo pós-vacinação contra rotavírus, conduzido no período de maio de 2009 a abril de 2011. Amostras positivas de acordo com a data de coleta.

Mês	Ano II 2009 – 2010	P	Ano III 2010 – 2011	P	Adenovírus / Total	P
Maio	3% (1/33)	0,0883	12,2% (5/41)	0,4377	8,1% (6/74)	0,4901
Junho	14,6% (6/41)	0,6414	6,9% (2/29)	0,8844	11,4% (8/70)	0,8189
Julho	12% (6/50)	0,3185	9,2% (5/54)	0,1172	10,5% (11/104)	0,6958
Agosto	16,2% (6/37)	0,1118	2,3% (1/44)	0,4255	8,6% (7/81)	0,0918
Setembro	3% (1/33)	0,3233	3,4% (1/29)	0,7782	3,2% (2/62)	0,3542
Outubro	4,1% (1/24)	0,8993	5,7% (2/35)	0,4181	5% (3/59)	0,5192
Novembro	10,5% (2/19)	0,4043	11,5% (3/26)	0,5488	11,1% (5/45)	0,7857
Dezembro	14,8% (4/27)	0,1417	4% (1/25)	0,1472	9,6% (5/52)	0,0537
Janeiro	3,8% (2/52)	0,2201	0% (0/32)	0,8814	2,3% (2/84)	0,4134
Fevereiro	3,9% (2/51)	0,0608	7,1% (2/28)	0,1004	5% (4/79)	0,6734
Março	0% (0/42)	0,9812	16% (4/25)	0,5525	5,9% (4/67)	0,7414
Abril	7,7% (3/39)	1,0000	3,8% (1/26)	1,0000	6,1% (4/65)	1,0000
Total	7,6% (34/448)	0,2147	6,8% (27/394)	0,6174	7,2% (61/ 842)	0,6553

Tabela 4 - Frequência de adenovírus de acordo com o mês da coleta do espécime fecal das 842 crianças participantes de estudo pós-vacinação contra rotavírus. Amostras coletadas no período de maio de 2009 a abril de 2011, em Belém, Pará.

5.6 DIVERSIDADES SOROTÍPICA E GENOTÍPICA DAS INFECÇÕES

Um total de 61 amostras positivas para HAdV pelas técnicas de EIE e IC foi encaminhado para a PCR, e, destas, 91,8% (56/61) denotaram amplificação pelos iniciadores genéricos Hex1Deg (*forward*) e Hex2Deg (*reverse*) (Figura 20).

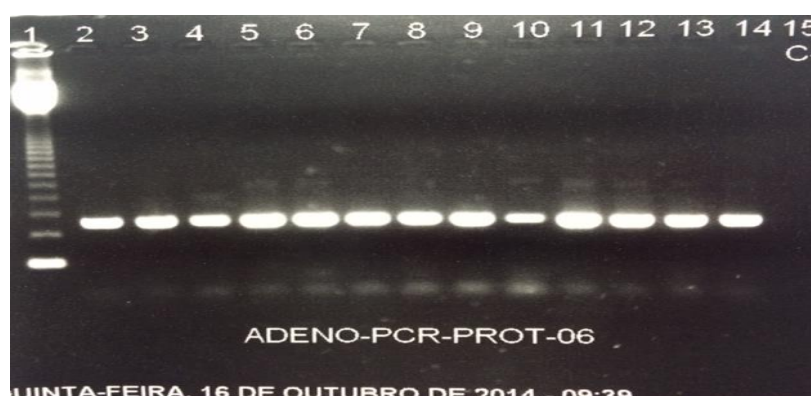


Figura 20: Resultados da PCR para o gene hexon. Fotografia de gel de agarose a 1,5%, contendo amostras positivas para HAdV usando o primer Hex1Deg e Hex2Deg amplificadas na altura de 301 pares de bases. Da esquerda para direita: no orifício 1 observa-se o peso molecular de 123 pares de bases, orifício 2 ao 13 revelam amostras positivas para HAdV e os orifícios 14 e 15 demonstram os controle positivo e negativo, respectivamente. **Fonte:** Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas.

Dentre as 56 amostras positivas para HAdV pela PCR, 80,3% (45/56) apresentaram a qualidade de amplificação necessária para serem definidas pela técnica de sequenciamento de nucleotídeos. O resultado apontou 64,5% (29/45) positivas para a espécie F, caracterizadas como HAdE. Observou-se um percentual de 35,6% (16/45) das crianças infectadas com adenovírus do tipo não entérico, sendo 15,5% (7/45) da espécie A, 11,1% (5/45) agrupadas com a espécie C, 4,4% (2/45) pertencentes à espécie B e 2,2% (1/45) para cada uma das espécies D e E de HAdV (Figura 21).

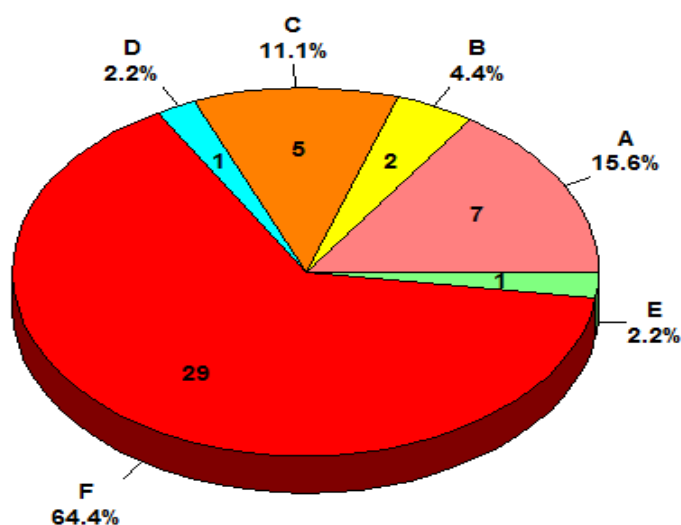


Figura 21: Resultados obtidos pela técnica de sequenciamento de nucleotídeos nas 45 amostras fecais positivas para adenovírus, provenientes de estudo em crianças hospitalizadas com gastroenterite após vacinação contra rotavírus no Brasil.

Os casos obtidos de HAdE, espécie F, foram caracterizados como sendo 69% (20/29) do subtipo 41 e 31% (9/29) pertencentes ao subtipo 40. Dentre as amostras que foram positivas para espécie A, 4 eram do tipo 12, 2 do tipo 31 e uma amostra do tipo 18. No tocante às agrupadas com a espécie C, todas 5 pertenciam tipo 1. Já as 2 positivas para espécie B se caracterizavam como do tipo 3, a da espécie D era 17 e a amostra positiva para espécie E também se caracterizou como tipo 4 (Figura 22).

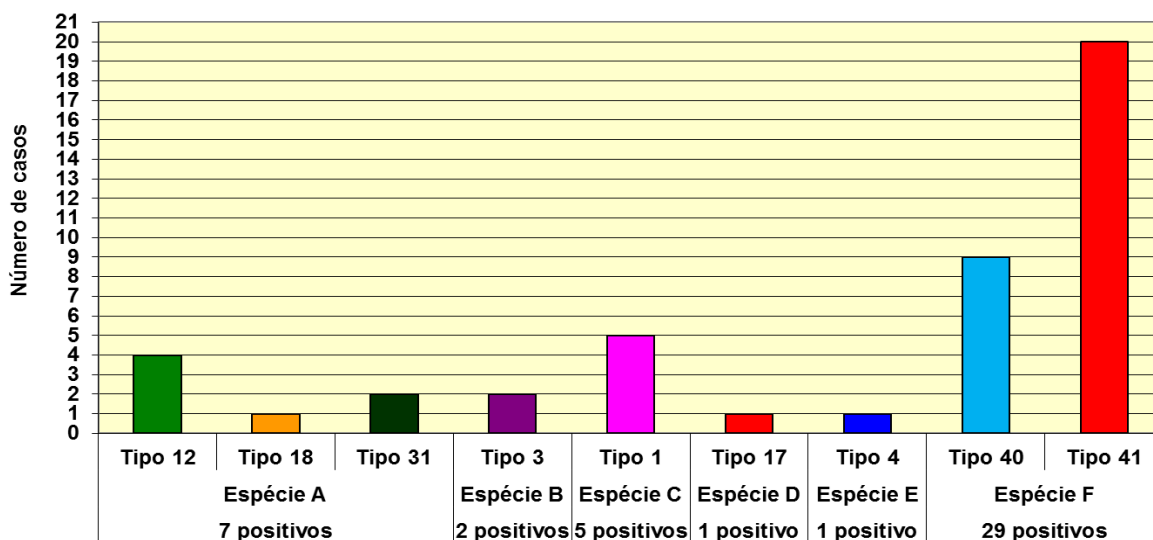


Figura 22: Resultado da caracterização por espécie e tipo de adenovírus definidos pela técnica de sequenciamento de nucleotídeos, em um total de 45 amostras sequenciadas do projeto rotavírus caso-controle, em Belém, PA, coletadas no período de maio de 2009 a abril de 2011, em espécimes fecais de crianças hospitalizadas com quadro de gastroenterite aguda.

Os resultados da análise filogenética destes 45 espécimes estão representados na Figura 22 e demonstram o agrupamento das amostras selecionadas entre as espécies A a G.

HEX-1 = Amostras positivas para HAdV em Belém

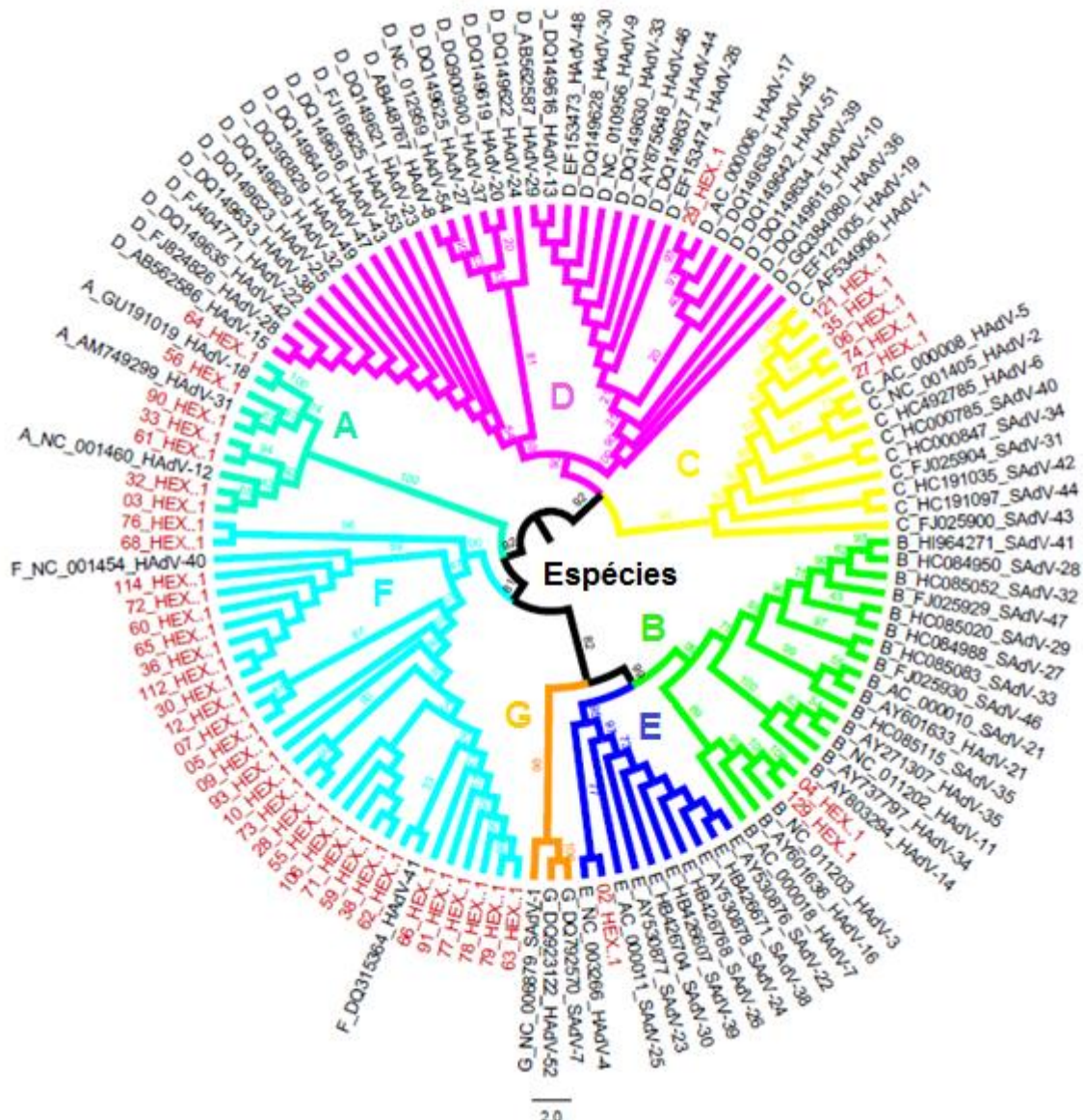


Figura 23: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene hexon envolvendo 45 amostras positivas para adenovírus provenientes do projeto pós-vacinação contra rotavírus na cidade de Belém, Pará. Os espécimes de cor vermelha denominados HEX-1 representam os casos positivos do presente estudo. Valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados.

As amostras de HAdV de A a F, do presente estudo, apresentaram similaridade nucleotídica variando de 86,9% a 98,8%. As espécies A (86,9%), C (90,4%) e F (92,2%) apresentaram os menores graus de similaridade interna em comparação com a espécie B (98,8%). Não foi possível comparar a similaridade nucleotídica intraespécie dos grupos E e D por haver apenas uma amostra positiva para cada.

Ao compararmos todas as espécies do presente estudo com os demais protótipos inseridos na figura 22, a similaridade entre os grupos de espécies variou

de 89,6% (espécie A) a 98,3% (espécie E). As amostras deste estudo positivas para a espécie F do tipo 41 apresentaram similaridade nucleotídica de 95% com espécime descrita por Lemiale et al, 2008, nos Estados Unidos (DQ315364). As amostras positivas do tipo 40, demonstraram similaridade nucleotídica de 96,8%, quando relacionadas à descrita por Davison et al, 1993, no Reino Unido (F_NC_001454). Os demais resultados de similaridade nucleotídica entre as amostras deste estudo e dos grupos de espécies comparados na análise filogenética estão inseridos na Tabela 5.

Espécie	Similaridade Nucleotídica	
	Entre as amostras do estudo	Entre o grupo de espécies
A	86,9%	89,6%
B	98,8%	91,7%
C	90,4%	90,5%
D	-	97,1%
E	-	98,3%
F	92,2%	92,7%
F tipo 40	96,6%	96,8%
F tipo 41	94,6%	95%

Tabela 5: Resultados da análise filogenética, exibindo o perfil de similaridade nucleotídica entre amostras fecais positivas para AdV e sequenciadas para o gene hexon. Espécimes obtidos do projeto “rotavírus caso controle”, coletados de maio de 2009 a abril de 2011, de crianças hospitalizadas na cidade de Belém, PA.

6. DISCUSSÃO

Os HAdV foram encontrados em 7,2% das amostras testadas neste estudo, sendo os HAdEs detectados em 3,7% do total ou 50,8% entre os casos positivos para HAdV, correspondendo, portanto, a uma parcela relativamente expressiva das amostras testadas. Ao compararmos os resultados deste estudo com os obtidos antes da introdução da vacina contra RV no Brasil, com amostras fecais de crianças coletadas em 2003 na cidade de Belém, PA, obteve-se um percentual de 5,8% (44/760) de positividade por meio das técnicas EIE e IC; ambas também utilizadas para a detecção de HAdV neste estudo (MÜLLER, 2011). No entanto, esta diferença de positividade não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,23$). Considerando que todas as crianças participantes do atual estudo eram vacinadas contra RV e o principal foco deste foi identificar se esta vacina aplicada em larga escala resultaria em aumento da prevalência de HAdV, observou-se que os resultados obtidos não sustentam esta hipótese.

Entretanto, ao compararmos os resultados da prevalência de HAdV deste estudo (7,2%), o qual ocorreu no período de maio de 2009 a abril de 2011, com um prévio realizado no período de maio de 2008 a abril de 2009 com crianças hospitalizadas na cidade de Belém, PA, observou-se que o primeiro ano do estudo detectou a presença de HAdV em 10% (40/400) das amostras testadas (MÜLLER, 2011). No entanto, apesar da positividade de HAdV ter sido maior neste primeiro ano de vigilância pós-vacinação contra RV no Brasil, esta diferença obtida comparando-se ambos estudos não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,09$).

Estudos anteriores levados a efeito na divisa das cidades de Ananindeua e Marituba, em uma comunidade quilombola, exibiram uma positividade maior de HAdV e HAdE, respectivamente, de 61,5% (48/78) e 9% (9/78) (SPADA et al., 2013). Resultados expressivos também se obtiveram em outra investigação realizada com amostras fecais de crianças hospitalizadas no período de março de 2012 a março de 2015, na cidade de Belém, o qual registrou uma positividade de 46,8% (81/173) para HAdV e 9,2% (16/173) para HAdE (REYMÃO et al, 2016). Entretanto, estes percentuais maiores podem estar relacionados às diferentes técnicas de detecção empregadas para a realização dos testes, uma vez que ambos utilizaram metodologia de biologia molecular enquanto que este estudo utilizou o método de diagnóstico por EIE e IC.

Os dados obtidos neste estudo são mais expressivos do que os observados em outras cidades brasileiras. Em uma avaliação realizada em Belo Horizonte, por exemplo, alcançou-se 4,1% (16/392) de positividade com amostras fecais de crianças com e sem gastroenterite (DUARTE et al, 2012). Outro estudo realizado com pacientes pediátricos atendidos em um serviço de emergência na Bahia, com quadro de gastroenterite, detectou 4,2% de espécimes positivos para HAdV (ROCHA, 2012). Isto também foi verificado em amostras de crianças diarreicas analisadas nas cidades do Rio de Janeiro, Niterói, Londrina e Juiz de Fora, com uma positividade de 1,55% para HAdE (SOARES et al., 2002). Outras localidades do Brasil demonstraram frequências de positividade que variaram de 2% a 5,4% nas cidades de Goiânia, Salvador e Porto Velho (CARDOSO et al., 2002; ROCHA, 2012; AMARAL et al, 2015).

Ao compararmos os dados deste estudo com aqueles oriundos de outros países, observou-se que na Argentina a frequência para HAdV foi menor tanto em Córdoba, com 1,5% (GIORDANO et al., 2001) como em Buenos Aires com 3% de positividade (BERECIARTU et al., 2002). Em Roma, na Itália esta positividade foi de 1,5% (DJENEBA et al, 2007), na Grécia, 3,5% (LEVIDIOTOU et al, 2009), e no Irã 2,3% de casos positivos, todos observados em crianças com gastroenterite (HAMKAR et al, 2010). Já uma outra pesquisa, também conduzida no Irã, relatou positividade de 5,1% (SHOJA et al, 2014), sendo este um resultado próximo à prevalência de HAdV encontrada no presente estudo. No entanto, a região de Coimbra, em Portugal, apresentou resultados mais elevados para os testes de HAdV, com 13,1% (32/244) de amostras positivas em crianças hospitalizadas com quadro diarreico (RODRIGUES et al, 2007).

A presente investigação realizada em Belém apresentou um percentual de casos positivos para os HAdE (3,7%) similar ao encontrado por outros autores. Um estudo conduzido na França (Paris) durante 2 anos, alcançou uma positividade de 3,5% para HAdE (LORROT et al., 2011). Na Tunísia registrou-se 6% de casos positivos para HAdV e os HAdE corresponderam a 57% (20/35) das amostras positivas (FODHA et al., 2006). Na Venezuela, em Portugal e no Irã, alcançou-se 5% de positividade para HAdE (GONZALEZ et al, 2011; ESCOBAR et al, 2013; DASHTI et al, 2016). No entanto, os HAdE foram encontrados em percentuais mais elevados na cidade de Shenzhen, China (9,65%); no Irã (6,7%); e em Berlim, Alemanha (14%), infectando crianças diarreicas hospitalizadas (HE E YANG, 2000; SADERI et

al., 2002; OH et al., 2003). Ou até em percentuais menores que neste estudo, tais como 1,9% de HAdE apresentado por Leite et al (1985).

Vale ressaltar que já se esperava uma maior prevalência para HAdE, uma vez que todas as crianças participantes se encontravam hospitalizadas com quadro de gastroenterite aguda grave. Neste caso, pode ser que a gastroenterite que levou à hospitalização destes menores fosse causada, de fato, pelos HAdV, uma vez que apenas dois casos de coinfeção com HAdV e RV foram identificados.

No que se refere aos resultados da comparação entre os testes de EIE e IC para detecção de HAdV, observou-se que estes agentes foram detectados em 5,6% (47/842) dos espécimes testados por ambas as técnicas. Comparando-se as técnicas de EIE e IC, o teste IC mostrou sensibilidade de 84% e especificidade de 99%. O percentual de concordância (98,36%) entre as técnicas empregadas neste estudo foi menor que o observado em 2003, no período pré-vacinação contra RV, o qual obteve 9,1% (15/164) de amostras positivas por ambas metodologias (MÜLLER et al, 2010). Não foram obtidos dados de estudos em outras localidades que tivessem como um dos objetivos a comparação entre estes dois métodos de diagnóstico. Estes dados reafirmam as especificidade e sensibilidade do teste de IC na triagem de HAdV e sugere que o teste IC pode ser utilizado na rotina laboratorial para o diagnóstico de HAdV em crianças com gastroenterite, apresentando menor custo em relação ao EIE e dispensando a utilização de equipamentos laboratoriais.

Todos os 842 espécimes incluídos no presente estudo foram previamente testados quanto à presença dos RV, com uma positividade de 20,4%. Analisando-se os resultados obtidos, observou-se um percentual de 0,2% (2/842) de casos de infecção mista (HAdV e RV) ou 3,3% (2/61) do total de amostras positivas. Em tais situações, a gastroenterite que levou à hospitalização pode ter sido causada tanto pelo RV quanto pelo HAdV, pois não se pode determinar qual o efetivo agente causal. Estes resultados foram inferiores aos observados em outro estudo realizado em Rondônia, com 477 crianças hospitalizadas com diarreia, o qual detectou cerca de 7% de espécimes contendo HAdV e RV (MAGALHÃES et al., 2007). Também foram mais expressivos os dados de coinfeção encontrados na Tunísia, com 9% (17/191); na Costa da Turquia, com 7,2% (23/363); e no Irã, com 4% de amostras positivas tanto para RV quanto HAdV (FODHA et al, 2006; OZDEMIR et al., 2010; MOTAMEDIFAR et al, 2013).

No entanto, os resultados de coinfeção entre RV e HAdV deste estudo foram idênticos (0,2%) aos registrados em Valência, Venezuela (GONZALEZ et al, 2011). Este achado também foi relatado em baixos percentuais em outras localidades: 2% em Coimbra (Portugal) e 1,2% na Bahia (RODRIGUES et al, 2007; ROCHA, 2012). Seria relevante considerar que uma outra pesquisa realizada em Goiânia não conseguiu identificar nenhum caso (0%) de coinfeção entre esses dois vírus (CARDOSO et al, 2002). Os resultados citados associados aos encontrados neste estudo, demonstram uma grande oscilação em relação aos casos de coinfeção viral; bem como enfatizam a importância da investigação de diversos agentes virais em quadros diarreicos de crianças hospitalizadas para o esclarecimento do agente etiológico.

No que concerne ao sequenciamento genômico, observou-se que dentre os espécimes positivos para HAdV detectados neste estudo, houve maior prevalência da espécie F (64,5%), com predominância do tipo 41 (69%). Estes dados corroboram os registrados em estudo prévio levado a efeito após a introdução da vacina contra RV, no período de 2008 a 2009, na cidade de Belém. Nessa investigação, a prevalência da espécie F foi de 70%, com clara predominância do tipo 41 (85,7%). Esta situação também já ocorria antes da introdução da vacina contra RV, pois no período de vigilância pré-vacinação, ocorrido em 2003, detectou a espécie F de HAdV em 80% (8/10) dos casos positivos, com o tipo 41 estando presente em 75% (6/8) das amostras sequenciadas (MÜLLER, 2011). Ou seja, a vigilância epidemiológica realizada em crianças com quadro de gastroenterite, tanto antes quanto após a vacinação contra RV na cidade de Belém, confirmou a espécie F (tipo 41) de HAdV como a mais prevalente na região. Este resultado foi similar com o observado em outros estudos conduzidos em vários países, os quais geralmente demonstram o predomínio do tipo 41 em relação ao tipo 40 (LI et al., 2004; 2005; LOGAN et al., 2006; HUH et al., 2009; ESCOBAR et al, 2013). Esta foi a mesma situação de um estudo conduzido no Vietnã, o qual apresentou o tipo 41 em 32 de 37 amostras positivas para HAdV sequenciadas (NGUYEN et al., 2007); além disso, a espécie F e tipo 41 foi detectada em 94,5% do total de amostras positivas na Tunísia (SDIRI-LOULIZI et al., 2009). Em outros países, como na Austrália, realizaram-se estudos que identificaram um aumento gradual na frequência do tipo 41, de modo que no período de 1981 a 1992 a prevalência deste subiu de 25% até atingir 100% dos casos positivos ao final do estudo (GRIMWOOD et al., 1995). No

entanto, na Alemanha, em 1983, um estudo realizado com crianças hospitalizadas identificou um perfil similar de circulação entre os tipos 40 e 41 (DE JONG et al., 1983).

Uma vez que os HAdV possuem como forma de transmissão a via fecal-oral, a origem de contaminação das crianças por estes vírus pode ter sido a inter-humana ou por meio da água destinada ao consumo e lazer. Estudos prévios realizados em ambientes aquáticos na cidade de Belém e na ilha de Mosqueiro, utilizando técnicas moleculares, detectaram a presença de HAdV em 26,5% e 34,5% das amostras analisadas. Nestes casos, a espécie F predominou em 100% dos casos de HAdV identificados por sequenciamento (SPADA, 2012; CORREA, 2014).

Apesar de a espécie F ter sido identificada na maioria dos casos positivos para HAdV, vale destacar que os HAdV da espécie A deste estudo corresponderam a 15,6% (7/45) entre as sequenciadas, sendo 4 do tipo 12, 1 do tipo 18 e 2 do tipo 31. Esta caracterização genética dos HAdV da espécie A em segundo lugar dentre os casos positivos já havia sido observada em outro estudo realizado em Belém, no período de 2008 a 2009, correspondendo a 20% (6/30) das amostras agrupadas; sendo 3 do tipo 31, 2 do tipo 12 e 1 do tipo 18 (MÜLLER, 2011). Estes dados são similares aos observados em outro estudo conduzido em Gana, o qual demonstrou 17,8% das amostras positivas agrupadas com a espécie A dos HAdV (SILVA et al., 2008). Há alguns anos, outros autores já postulavam a relação entre esta espécie (A) e a etiologia da gastroenterite aguda, sobretudo os tipos 31, 12 e 18 obtidos em amostras fecais de crianças (THÖRNER et al., 1993). Os resultados obtidos neste estudo confirmam os HAdV da espécie A, além da já estabelecida espécie F, como causa de diarreia aguda em crianças hospitalizadas.

Este estudo registrou 11,1% das amostras agrupadas com a espécie C (tipo 1), sendo este valor similar ao obtido anteriormente na cidade de Belém, o qual correspondeu a 10% das amostras sequenciadas (MÜLLER, 2011). No entanto, este resultado é menor que o observado por Silva e colaboradores em 2008, em Ghana, que obtiveram 15,1% de cepas da espécie C dos HAdV. Durante muitos anos esta espécie esteve relacionada à etiologia de manifestações respiratórias e infecções latentes do tecido linfóide (PRING AKERBLUM et al, 1999); no entanto, estudos mais recentes sugerem que a espécie C de HAdV pode estar relacionada à etiologia da gastroenterite (BENKO et al, 2008; BERK, 2013).

Outra possibilidade seria a de que os HAdV das espécies não entéricas detectados nos testes poderiam estar causando outros sintomas que não foram avaliados (tais como respiratórios ou oculares) e estarem sendo excretados através das fezes das crianças participantes deste estudo, considerando que foram identificados casos positivos para as espécies B (4,4%), D (2,2%) e E (2,2%). Não foi detectado nenhum caso positivo para a espécie G de HAdV, a qual tem sido relatada como agente etiológico de gastroenterite (JONES et al, 2007).

A análise filogenética das amostras positivas para HAdV da espécie F do tipo 41 demonstrou um perfil de similaridade nucleotídica de 95% com uma amostra encontrada nos Estados Unidos (LEMIALE et al, 2008). Já o tipo 40 foi comparado à um protótipo do Reino Unido, obtendo-se um percentual de 96,6% de similaridade entre os nucleotídeos (DAVISON et al, 1993). Entretanto, se compararmos apenas as amostras do presente estudo, observou-se que a variabilidade nucleotídica entre as espécies oscilou de 1,2% a 13,1%, sendo as amostras mais discrepantes encontradas na espécie A.

A análise quanto ao gênero das crianças participantes deste trabalho não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,73$) entre os sexos feminino (7,7%) e masculino (6,8%). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores realizados em Belém, o qual avaliou este parâmetro tanto com amostras do período pré-vacinação quanto após a introdução da vacina contra RV (MÜLLER, 2011). Este perfil também foi observado na Turquia e no Irã, onde outras investigações demonstraram índices mais elevados de HAdV em crianças do sexo masculino, mas o valor não chegou a ser estatisticamente significativo (OZDEMIR et al., 2010; MOTAMEDIFAR et al, 2013). No entanto, estes resultados estão em desacordo com outro estudo conduzido com menores de 5 anos no Irã, o qual identificou clara predominância de casos positivos entre o sexo masculino (62,9%) em relação ao sexo feminino (37,1%), sendo este achado estatisticamente significativo (DASHTI et al, 2016).

No que se refere à distribuição por idade das crianças participantes deste estudo, observou-se que o grupo mais acometido pelos HAdV ficou entre os maiores de 24 meses (8,9%); no entanto, este dado não foi estatisticamente significativo quando comparado com os demais grupos etários. A frequência maior nesta faixa etária é concordante com outras investigações, a quais evidenciaram maior positividade de HAdV em crianças maiores de 24 meses, porém menores de 5 anos

de idade (HAMKAR et al, 2010; SHOKROLLAHI et al, 2014). Diferentemente dos RV, com maior frequência na faixa etária compreendida entre 6 e 17 meses de idade (MOTAMEDIFAR et al, 2013). Outro estudo conduzido no Brasil, na cidade de Goiânia, mostrou que a faixa etária de maior prevalência para HAdV situava-se entre 1 e 3 anos de idade (CARDOSO et al., 2002). No entanto, um trabalho realizado no Irã identificou as crianças menores de 24 meses como os mais acometidos pela infecção por HAdV (91,6%), sendo 58,3% dos casos entre os menores de 12 meses e 33,3% na faixa etária de 12 a 23 meses (DASHTI et al, 2016).

No que se refere à distribuição temporal dos casos positivos para HAdV, este estudo demonstrou a circulação do vírus em todos os meses do ano, registrando-se maior detecção nos meses de junho (11,4%) e novembro (11,1%). Esta diferença de positividade obtida ao longo dos meses não foi estatisticamente significativa, conforme está representado na Tabela 4 (pág. 53). Estes resultados estão de acordo com outro estudo realizado em Belém, o qual identificou mais casos de HAdV no mês de junho (21%) entre crianças vacinadas contra RV (MÜLLER, 2011). No entanto, um estudo anterior conduzido antes da vacinação contra RV também na cidade de Belém (em 2003), detectou maior frequência para HAdV no mês de março (10%) (MÜLLER et al, 2010).

Diferentemente do observado nas demais regiões brasileiras, o estado do Pará não conta com a divisão sazonal em quatro estações climáticas ao longo do ano. Portanto, os critérios relativos aos índices de precipitação pluviométrica desta região são referentes a períodos de mais chuva ou menos chuva, com variações de temperatura que refletem mais ou menos calor. Na avaliação do perfil sazonal de distribuição dos HAdV, observou-se que sua prevalência na cidade de Belém não sofre alterações significativas quanto às variáveis de temperatura e precipitação pluviométrica, já que foram obtidos picos de detecção de HAdV tanto em um mês classificado como chuvoso e de menor temperatura (novembro), quanto em um mês tido como período de menos chuva e maior temperatura (junho).

Alguns estudos sobre a ocorrência de RV, relatam distribuição tipicamente sazonal das infecções por esses agentes, com maior prevalência entre os meses de janeiro a março, onde há períodos com mais altos índices de precipitação pluviométrica ou o inverno típico (LEVIDIOTOU et al, 2009; GONZALEZ et al, 2011; ESCOBAR et al, 2013). No Brasil, região norte especificamente, os RV predominam nos meses de julho a setembro (FERNANDES et al, 2000), correspondendo a

períodos mais quentes e com menor precipitação pluviométrica. No que tange aos HAdV do presente estudo, o perfil de sazonalidade se mostra diferente, similares, contudo, aos obtidos em outras pesquisas conduzidas em países de clima temperado ou não, os quais não demonstram sazonalidade para este vírus (BASU et al, 2003; FILHO et al, 2007; LEVIDIOTOU et al, 2009; GONZALEZ et al, 2011; REYMÃO et al, 2016). Um estudo conduzido no Irã detectou maior prevalência de HAdV nos meses de julho e outubro, mas este achado, assim como na presente investigação, não revelou diferenças estatisticamente significativas (MOTAMEDIFAR et al, 2013). No entanto, uma investigação também realizada no Irã identificou mais alto índice de positividade (77,8%) para HAdV no período do inverno (HAMKAR et al, 2010).

Dentre as limitações do presente estudo, podem ser destacados o fato de não ter sido realizada a pesquisa de outros enteropatógenos (virais, bacterianos ou parasitários), eventualmente associados à gênese da gastroenterite. Também não incluiu a técnica de PCR para o diagnóstico das infecções por HAdV. Outra limitação seria que esta investigação não contemplou um grupo-controle não diarreico que melhor configurasse a postulada relação causa-efeito entre a gastroenterite e a presença de HAdV.

Os dados encontrados neste estudo corroboram os descritos por Rocha (2012), os quais sugeriram o monitoramento das infecções por causas virais e mistas; podendo contribuir com informações que visem a nortear ações para a redução dos impactos socioeconômicos relacionados às diarreias virais, tais como perda de dias de trabalho por parte dos pais, perda de rendimento escolar das crianças, aumento da demanda por serviços de saúde e hospitalização.

A realização de investigações como esta, com a elucidação dos novos agentes virais como causa de gastroenterite, além dos RVs, pode atualizar os profissionais de saúde, sobretudo pediatras, no sentido de evitar a prescrição indiscriminada de antibióticos e incentivar o uso racional de medicamentos. Isso compreende a reidratação precoce e a adoção de medidas higiênicas e sanitárias preventivas no que concerne aos quadros de diarreia aguda infantil.

Perspectivas para a continuação deste estudo envolverão a análise quanto a presença e perfil molecular de HAdV e outros agentes virais em amostras obtidas em outras localidades do Brasil, após a introdução da vacina contra RV. Os estudos adicionais também compreenderão a análise e a comparação de nucleotídeos e

aminoácidos do gene *hexon*, detectando-se possíveis variações na epidemiologia molecular dos HAdV.

7. CONCLUSÕES

- ❖ Os resultados obtidos neste estudo confirmam a circulação de HAdV em Belém, Pará, após a vacinação em larga escala contra RV a partir de 2006.
- ❖ A espécie F (tipo 41) foi identificada como a mais prevalente, mas também se detectou a presença das espécies A e C causando gastroenterite, sendo que a similaridade nucleotídica entre as espécies deste estudo foi alta.
- ❖ Não foi detectado nenhum caso positivo para a espécie G de HAdV.
- ❖ Não houve diferenças de positividade entre o gênero e idade das crianças infectadas, sem perfil temporal e de sazonalidade para esta região; com apenas 2 casos de coinfeção entre RV e HAdV.
- ❖ Recomenda-se a técnica de IC como alternativa ao método EIE.
- ❖ Portanto, este estudo ressalta a importância do estabelecimento de uma vigilância em longo prazo para avaliação do impacto de outros agentes virais na etiologia das gastroenterites infantis.

8. REFERÊNCIAS

AAP (American Academy of Pediatrics); CID (Committee on Infectious Diseases). Prevention of rotavirus disease: guidelines for use rotavirus vaccine. **Pediatrics, Evanston IL**, v.102, n. 6, p.1483-1491. 1998.

AKUSJÄRVI, G.; PETTERSSON, U.; ROBERTS R. J.; Structure and function of the adenovirus-2 genome. In Doerfler W (ed): Adenovirus DNA. **Martinus Nijhoff**, Boston, 1986.

ALBERT, M. J. Enteric adenoviruses. Brief Review. **Arch. Virol.**, 88: 1-7,1986.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. **J. Clin. Microbiol.** 39: 498-505, 2001.

AMARAL, M. S. C.; ESTEVAM, G. K.; PENATTI, M.; LAFONTAINE, R.; LIMA, I. C. G.; SPADA, P. K. P.; GABBAY, Y. B.; MATOS, N. B. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro: 1-7, 2015.

ARAÚJO, E. C. et al. Segurança, imunogenicidade e eficácia protetora de duas doses da vacina RIX4414 contendo rotavirus atenuado de origem humana. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, 83(3), p. 217-224, 2007.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5**: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. 5.ed. Belém: Publicações Avulsas do Mamirauá, 2008.

BAUM, S.G. Adenovirus. In: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: **Churchill Livingstone**, 1624-30, 2000.

BARRAZA, E. M.; LUDWIG, S. L.; GAYDOS, J. C. et al. Reemergence of adenovirus type 4 acute respiratory disease in military trainees: Report of an outbreak during a lapse in vaccination. **J Infect Dis**, 179: 1531-1533, 1999.

BARRELLA, K.M.; GARrafa, P.; MONEZI, T.A.; HÁRSI, C.M.; SALVI, C.; VIOLANTE, P.A.B.C.; MEHNERT, D.U. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. **Brazilian J Microbiol.** 40:102-107, 2009.

BASU, G.; ROSSOUW, J.; SEBUNYA, T. K.; GASHE, B. A.; DE BEER, M.; DEWAR, J. B.; STEELE, A. D. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. **East Afr Med J**, 80(12):652-5. Dec, 2003.

BENKO, M.; ELO, P.; URSU, K; AHNE, W.; LAPATRA, S.E.; THOMSON, D.; HARRACH, B. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. **J Virol.** 76(19): 10056-10059, 2002.

BENKO, M; HARRACH, B; BOTH, G. W. et al. Family Adenoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. **Virus Taxonomy**. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 213-228, 2005.

BENKO, M. Adenoviruses: Pathogenesis. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, eds. **Encyclopedia of Virology**. 3^a ed. Oxford, UK: Elsevier, 2008: 24-29.

BERECIARTU, A.; BOK, K.; GÓMEZ, J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. et al., 2002). **J. Clin. Virol.**, 25(2): 197-203, 2002.

BERK, A. J. Adenoviridae: Classification, virion structure and perspectives. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, ed. 6 Lippincott-Williams & Wilkins, v.2, p.1704-1728. 2013.

BERK, A. J. Disponível em www.pnas.org. Acessado em 23/03/2016.

BLACK, R. E.; MORRIS, S. S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year?. **The Lancet**:12. 361(1):2226-2234. 2010.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L. ; LAWN, J. E.; Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas. **DOI: 10.1590/1413-812320141910.09282014**. 2014.

BLACKLOW, N. R & GREENBERG, H. B. Viral gastroenteritis. *N. Engl. J Med.*, 325:252-264, 1991.

BRASIL. Informe técnico. Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH). **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2006.

BRASIL. Informe técnico. Rotavírus: vacina evita 850 óbitos de bebês por ano. Agência Saúde. **Ministério da Saúde**. 2006b, Disponível em: http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas_noticias/24263_saude_060306. Acesso em: 23/03/2016.

BRASIL. Informe técnico. Mortalidade infantil causada por diarreia cai 93,9% em 25 anos no país. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2008.

BROKER, T.R. In Processing of RNA. **Apirion**, 2 ed: 181-212, 1984.

BROWN, M.; GRYDSUK, J. D.; FORTSAS, E. Petric M. Structural features unique to enteric adenoviruses. **Arch Virol Suppl**, 12:301-7, 1996.

BUHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A. S.; HACON, S. S.. Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas. **Ciênc. saúde coletiva**. 2014, vol.19, n.10.

CARDOSO, D. D. P.; MARTINS, R. M. B.; KITAJIMA, E. W.; BARBOSA, A. J.; CAMAROTA, S. C. T.; AZEVEDO, M. S. P. Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia - GO, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. vol.34 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2002.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Arch Virol**. Virology Division News. 155:133–146, 2010.

CARTER, M. J. A review: Enterically infection viroses: pathogenicity, transmission and significant for food and waterborne infection. **J appl Microbiol**. 98:1354-80. 2005.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ARAÚJO, I. T.; ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; MARTINS, C. M. M. A.; BÓIA, M. N.; LEITE, J. P. G. Rotavírus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infec Dis**. v. 15, n. 1, p. 95 – 97, 2009.

COUCH, R. B.; CHANOCK, R. M.; CATE, T. R. et al. Immunization with types 4 and 7 adenovirus by selective infection of the intestinal tract. **Am Rev Respir Dis**, 88: 394403, 1963.

CRAWFORD-MIKSA, L. SCHNURR, D. P. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotypespecific residues. **J virol**. 70: 1836-1844, 1996.

CORREA, V. C.; SANTOS, D. S. A. S.; TEIXEIRA, D. M.; DEUS, D. R.; SOUZA, N. R.; VALE, E. R.; MORAIS, L. L. C. S.; GABBAY, Y. B. Detecção de adenovírus humano na Ilha de Mosqueiro região metropolitana de Belém, PA, Brazil. **XVII Congresso Médico Amazônico**. 14 a 17 de 2014. Belém, PA. 2014.

DASHTI, A. S.; HASHEMPOOR, P. G. T.; KARIMI, A. Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. **Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice**. Volume 2016, Article ID 2045697, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2045697>. 2016.

DATASUS / SINASC / DEVES. <http://indicadores.cidadessustentaveis.org.br/br/PA/belem/mortalidade-infantil>. Acesso em: 29/03/2016.

DAVISON, A. J.; TELFORD, E. A.; WATSON, M. S.; MCBRIDE, K.; MAUTNER, V. The DNA sequence of adenovirus type 40. **J. Mol. Biol**. 234 (4), 1308-1316. 1993.

DAVISON, A. J.; BENKO, M. et al. Genetic content and evolution of adenoviruses. **J Gen Virol**, v.84, n.pt. 11, Nov, p.2895-908. 2003.

DE CLERCQ, E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. **Biochem Pharmacol**, 82:99-109. 2011.

DE JONG, J. C.; WIGAND, R.; KIDD, A. H.; WADELL, G.; KAPSENBERG, J. G.; MUZERIE, C. J.; WERMENBOL, A. G. Candidate adenovirus 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. **J. Med. Virol.** 11: 215-231, 1983.

DIETRICH, F. Virologia. Revisão e adaptação de Elfried Kirchner. **Virologia do Instituto de Medicina Tropical** da USP. São Paulo: E.P.U: EDUSP, 1979.

DJENEBA, O.; DAMINTOTI, K.; DENISE, I.; CHRISTELLE, N. W.; VIRGILIO, P.; ADRIEN, B.; JACQUES, S.; GUSTAVE, K.; SALVATORE, P.; LAYA, S. Prevalence of rotavirus, adenovirus and enteric parasites among pediatric patients attending Saint Camille Medical Centre in Ouagadougou. **Pak J Biol Sci.** Dec 1;10(23):4266-70. 2007.

DUARTE, R. J.; MENDES, E. N.; PENNA, F. P. et al. Prevalência baixa de adenovírus em crianças com diarreia em Belo Horizonte-MG. **Bras Patol Med Lab.** p 259-263. 2012.

DUGGING, B.A; Wagner S.C.; Zeller J.A. et al. Fatal pneumonia associated with adenovirus type 7 in three military trainees. **N Engl J Med.** 286: 1289-1292,1972.

ENGLER, J. A.; HONG, J. S. Characterization of the adenovirus fiber protein. **Methods Mol Med**, v.131, p.281-98. 2007.

ESCOBAR, C.; SILVA, T.; COSTA, B.; OLIVEIRA, M.; CORREIA, P.; FERREIRA, G. C.; COSTA, I.; JÚLIO, C.; RODRIGUES, J.; MACHADO, J. et al. Gastroenterite aguda em crianças internadas na área de Lisboa. 0873-9781/13/44-4/148. **Acta Pediátrica Portuguesa.** Sociedade Portuguesa de Pediatria. 2013.

FERNANDES. J. V.; FONSECA, S. M. D.; AZEVEDO, J. C. V.; MARANHÃO, H. et al. Detecção de rotavírus nas fezes de crianças com diarreia aguda. **J Pediatr (Rio J):** 76(4):300-4. 2000.

FERREIRA, L. M.; COSTA, I.V. Pesquisa de adenovírus entéricos e astrovírus em espécimes fecais de crianças diarreicas provenientes de São Luiz, Maranhão. 2004. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Farmacêuticas) – Área de Ciências da Saúde, **Universidade Federal do Pará**, Belém, 2004.

FERREIRA, L. M.; MORAIS, M.A.A.; COSTA, I.V.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. LUZ, C.R.N. Detection of adenovirus type 40/41 in hospitalized children from Sao Luiz, Maranhão.. **Virus Reviews & Research.** NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 15, São Pedro, 2004.

FERREIRA, J. A. et al . Detecção e caracterização de adenovírus humano proveniente de casos de paralisia flácida aguda, na Região Norte do Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 47-54, set. 2014.

FILHO, E. P.; COSTA FARIA, N. R.; FIALHO, A. M.; ASSIS, R. S.; ALMEIDA, M. M.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; SANTOS, F. B.; BARRETO, M. L.; LEITE, J. P. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. **J Med Microbiol.** Mar; 56(Pt 3):313-9, 2007.

FLOMENBERG, P.; GUTIERREZ, E. et al. Detection of adenovirus DNA in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction assay. **J Med Virol**, v.51, n.3, Mar, p.182-8. 1997.

FLEWETT, T. H. Diagnosis of enteritis virus. **Proc R Soc Med**, v.69, n.9, Set, p.693-6. 1976.

FODHA, I.; CHOUIKHA, A.; PEENZE, I.; DE BEER, M.; DEWAR, J.; GEYER, A.; MESSAADI, F.; TRABELSI, A.; BOUJAAFAR, N.; TAYLOR, M. B.; STEELE, D. Identification of viral agents causing diarrhea among children in the Eastern Center of Tunisia. **J Med Virol**. Sep;78(9):1198-203, 2006.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Bio Rev**. 69:357-371. 2005.

FOX, JP. BRANDT, CD. WASSERMANN, FE, *et al*. The Virus Watch Program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretions patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infection and relation to illness. **Am J Epidemiol**; 89:25-50, 1969.

GAYDOS, C. A.; GAYDOS, J. C. Adenovirus vaccines in the U. S. military. **Mil Med**, v.160, n.6, Jun, p.300-4. 1995.

GBD 2013. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, 385: 117–71. 2015.

GINELLI, A. et al. Intussuscepção. Disponível em: <http://www.ctscan.com.br/casosclinicos/clinicamedica/intussuscepcao/index.php>. Acesso em: 23 abr. 2016.

INGSBERG H. S.; MOLDAWER L. L.; SEGAL P. B. et al. A mouse model for investigation the molecular pathogenesis of adenovirus disease. **Proc Nat Acad Sci USA**; 88:1651-1655, 1991.

GIORDANO, M.O., FERREYRA, L.J., ISA, M.B., MARTINEZ, L.C., YUDOWSKY, S.I. & NATES, S.V. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba city, Argentina: an insight of disease burden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 43 (4): 193-197, 2001.

GONÇALVES, M. F. A. V.; DE VRIES, A. A. F. Adenovirus: from foe to friend. **Rev Med Virol**. 16(3):167-186. 2006.

GONÇALVES, G.; GOUVEIA, E.; MESQUITA, J. R.; ALMEIDA, A.; RIBEIRO, A.; ROCHA-PEREIRA, J. Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. **Epidemiol Infect**. 15:1-4. 2010.

GONZALEZ, G.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Molecular Epidemiology of Enteric Viruses in Children With Sporadic Gastroenteritis in Valencia, Venezuela. **Journal of Medical Virology**. 83:1972–1982. 2011.

GRIMWOOD, K.; CARZINO, R.; BARNES, G. L.; BISHOP, R. F. Patients with enteric adenoviruses gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. **J Clin Microbiol**, 33:131-136, 1995.

HALL, K.; BLAIR ZAJDEL, M.E.; BLAIR, G.E. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. Review. **Biochem J**. 431(3):321-36, 2010.

HAMKAR, R; YAHYAPOUR, Y; NOROOZI, M; NOURIJELYANI, K; et al. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus and Astrovirus Infections among patients with Acute Gastroenteritis in, Northern Iran. **Iranian J Publ Health**. Vol 39, n 2: pp45-51. 2010.

HE, Y., YANG, H. Typing of enteric adenoviruses in feces of infants with diarrhea. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**; 14(3): 278-80, 2000.

HORRWITZ, M. S. ADENOVIRUSES. IN: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Virology**, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2149-71, 2001.

HOSTETLER, K. Y. Alkoxyalkyl produrgs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. **Antiviral Res**: 2009; 82:A840-A98.

HUH, J. W.; KIM, W. H.; MOON, S. G.; LEE, J. B.; LIM, Y. H. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. **J Clin Virol**. Feb;44(2):152-6, 2009.

HUSSAIN, M. A.; COSTELLO, P. et al. Comparison of primer sets for detection of fecal and ocular adenovirus infection using the polymerase chain reaction. **J Med Virol**, v.49, n.3, Jun, p.187-94. 1996.

IBGE. Senso 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 23/04/2016.

JAWETZ, E; HANNA, L. SONNE, M. A laboratory infection with adenovirus type 8. **Am J Hyg**; 69:13-20, 1994.

JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. **Environ Sci Technol**. 40:7132-40. 2006.

JONES, M. S.; II, HARRACH, B.; GANAC, R. D.; GOZUM, M. M.; DELA CRUZ, W. P.; RIEDEL, B., PAN, C., DELWART, E. L. & SCHNURR, D. P. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **J Virol** 81: 5978–5984, 2007.

KAJON A. E., GIGLIOTTI A. P., HARROD K. S. Acute inflamatory response and remodeling of airway epithelium after subspecies B1 human adenovirus infection of the mouse lower respiratory tract. **J Med Virol**; 71:233-244, 2003.

KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: **Virology, Fields** KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 3rd. ed. vol 2, p. 1657 -1708. 2007.

KASEL, J. A. Adenoviruses. In: Lennette EH, SCHMIDT, N.J. eds. Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections. Washington, DC: **American Public Health Association**: 229-256, 1979.

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

KIM, W. H.; MOON, S. G.; LEE, J. B.; LIM, Y. H. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. **J Clin Virol.** Feb;44(2):152-6, 2009.

KINCHINGTON, P. R.; ROMANOWSKI, E. G. et al. Prospects for adenovirus antivirals. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.4, Apr, p.424-9. 2005.

KOTLOFF, K. L., LOSONSKY, G. A., MORRIS JR., J. G., WASSERMAN, S.S., SINGH-NAZ, N. & LEVINE, M.M. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: epidemiologic study in three clinical settings. **Pediatrics**, 84: 219-225, 1989.

LEBARON, C. H., FURUTAN, N. P., LEW, J. F., ALLEN, J.R., GOUVEA, V., MOE, C. & MONROE, S. S. Viral agents of gastroenteritis. **Public health importance and outbreak management.** MMWR, 39: 1-24, 1990.

LEEN, A. M; BOLLARD, C. M.; et al. Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, 12:243-251, 2006.

LEITE, J. P., PEREIRA, H. G., AZEVEDO, R. S., SCHATZMAYR. Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Virol.**, 15 (2): 203-9, 1985.

LEMIALE, F.; HADDADA, H.; NABEL, G. J.; BROUGH, D. E.; KING, C. R.; GALL, J. G. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. **Vaccine** 25 (11), 2074-2084, 2007.

LEVIDIOTOU, S.; GARTZONIKA, C.; PAPAVENTSIS, D.; CHRISTAKI, C.; PRIAVALI, E.; ZOTOS, N.; KAPSALI, E.; VRIONI, G. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. **Clin Microbiol Infect.** Jun;15(6):596-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02855.x. 2009.

LI, L.; SHIMIZU, H. DOAN, L. T., TUNG, P. G.; OKITSU, S.; et al. Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. **J Clin Microbiol**, 42:4032-4039, 2004

LI, L.; PHAN, T. G.; et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. **Microbiol Immunol**, 49: 121-128, 2005.

LINHARES, A. C.; BRESEE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Ver Panam Salud Publica**, v. 8, n. 5, p. 305-31, 2000.

LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Ped. Rio de Janeiro**, v. 82, (Supl 3):S25-34, 2006.

LINHARES, A. C. et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. **Lancet**, v. 371, p. 1181-1189, 2008.

LINHARES, A. C.; JUSTINO, M. C. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. **Expert Rev Vaccines**. 13(1):43-57. <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2014.861746>. 2014.

LIU, H.; JIN, L.; KOH, S. B.; et al. Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. **Science**. 329:1038-1043, 2010.

LIU, J.; PLATTS-MILLS, J.; JUMAT, J. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **Lancet**; 388: 1291–301, 2016.

LOGAN, C.; O'LEARY, J. J. et al. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **J Clin Microbiology**, v.44, n.9, Set, p.3189-95. 2006.

LORROT, M.; BON, F.; EL HAJJE, MJ.; AHO, S.; WOLFER, M.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; MARC, E; RAYMOND, J.; LEBON, P.; POTHIER, P.; GENDREL, D. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 30(3):361-8. Mar, 2011.

LYONS, A.; LONGFIELD, J.; KUSCHNER, R.; et al. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. **Vaccine**: 26:2890-2898. 2008.

MAGALHÃES, G. F.; NOGUEIRA, P. A.; GRAVA, A. F.; PENATI, M.; SILVA, L. H.; ORLANDI, P. P. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102(5):555-7. Aug, 2007.

MENDES, P. S.; RIBEIRO, JR. H. C.; MENDES, C. M. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **J Pediatr (Rio J)**. 89:315-25. 2013.

MISODOR, 2008. Doenças Diarreicas: Assistência e Controle. Disponível em: <<http://www.misodor.com/DIARREIA.html>>. Acesso em: 3 mai. 2010.

MOTAMEDIFAR, M.; AMINI, E.; SHIRAZI, P. T. Frequency of Rotavirus and Adenovirus Gastroenteritis Among Children in

Shiraz, Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. 15(8): 729-33. DOI: 10.5812/ircmj.4415. 2013.

MUNOZ, F. M.; PIEDRA, P. A. et al. Disseminated adenoviruses disease immunocompromised and immunocompetent children. **Clin Infect Dis**, V.27, n.5, Nov, p.1194-200, 1998.

MÜLLER, E. C. A.; MORAIS, M. A. A.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; FERREIRA, M. G. M. Enteric adenovirus as a cause of severe gastroenteritis among children living in Belem. In: XVI Encontro Nacional de Virologia, Salvador. **Virus Reviews & Research** – Journal of the Brazilian Society for Virology, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, v. 10 p. 137. 2005.

MÜLLER, E. C. A.; MORAIS, M. A. A.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. Ocorrência de adenovirus em crianças com gastroenterite aguda grave na Cidade de Belém, Pará, Brasil. doi: 10.5123/S2176-62232010000300007. **Rev Pan Amaz Saude**. 1(3):49-55. 2010.

MÜLLER, E. C. A. Prevalência de adenovirus em crianças com gastroenterite aguda grave antes e após a introdução da vacina contra rotavirus na cidade de Belém, Pará. Dissertação de mestrado em Patologia das Doenças Tropicais. **Dissertação de mestrado. UFPA**, Belém. 2011.

NGUYEN, T. A.; YAGYU, F.; OKAME, M.; PHAN, T. G.; TRINH, Q. D.; YAN, H.; HOANG, K. T.; CAO, A. T.; LE HOANG, P.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. **J Med Virol**. May;79(5):582-90, 2007.

OH, D. Y., GADEDICKE, G., SCHREIER E. – Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence molecular diversity. **J. Med. Virol.**, 71 (1): 82-93, 2003.

OKITSU-NEGISHI, S.; NGUYEN, T. A.; et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. **Pediatr Int**, v.46, n.2, Apr, p-245-52. 2004.

OZDEMIR, S.; DELIALIOĞLU, N.; EMEKDAŞ, G. Investigation of rotavirus, adenovirus and astrovirus frequencies in children with acute gastroenteritis and evaluation of epidemiological features. **Mikrobiyol Bul**, 44(4):571-8. Out, 2010.

PEREIRA, F.; MACIEL, L. PCR quantitativo em tempo real. Publicações Weinmann. 2004. Disponível em www.publicacoesweinmann.com.br. Acesso em 23/03/2016.

PRING-AKERBLOM, P.; TRIJSSENAAR, F. E.; ADRIAN, T.; HOYER, H. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. **J Med Virol.**, 58 (1): 87-92, 1999.

PURKAYASTHA, A.; SU, J.; MCGRAW, J. et al. Genomic and bioinformatics analyses of HAdV-4vac and HAdV-7vac, two human adenovirus (HAdV) strains that constituted original prophylaxis against HAdV-related acute respiratory disease, a reemerging epidemic disease. **J Clin Microbiol**, 43:3083-3094, 2005.

QUEIROZ, J. T. M.; HELLER, L.; SILVA, S. R. Análise da Correlação de Ocorrência da Doença Diarreica Aguda com a Qualidade da Água para Consumo Humano no Município de Vitória - ES. **Saúde e Sociedade**, v 14. 18(3):479-489. 2009.

REYMÃO, T. K. A.; QUINDERÉ-NETO, G. A.; LIMA, I. C. G.; SOUZA-JUNIOR, E. C.; SILVA, L. D.; TEIXEIRA, D. M. et al. Norovirus and adenovirus viremia in hospitalized diarrheic children from Belém, Pará, Brazil. 2016.

ROCHA, S. R. F. Estudo epidemiológico e etiológico de crianças com diarreia aguda por norovírus e outros agentes em unidade de emergência pediátrica, Salvador Bahia. **Monografia de conclusão do componente curricular MED-B60**. UFBA. Salvador, BA. 2012.

RODRIGUES, F.; ALVES, M. C.; ALVES, A. F.; LEMOS, L. Etiologia das gastroenterites agudas em Unidade de Internamento de Curta Duração: estudo prospectivo de 12 meses. 0873-9781/07/38-1/13 **Acta Pediátrica Portuguesa**. Sociedade Portuguesa de Pediatria. 2007.

ROWE, W. P. et al. Cytomegalic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc. Soc. exp. Biol.**, New York **92**:418-24, 1956.

ROWE, W. P. et al. Detection of human salivary gland virus in mouth and urine of children. **Amer. J. Hyg.**, **67**:57-65, 1958.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PÉREZ-SCHAEL, I.; VELÁZQUEZ, F. R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S. C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F.; GILLARD, P. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N Engl J Med**. Jan 5;354(1):11-22. 2006.

RUUSKANEN, O.; MEURMAN, O.; AKUSJARV, G. Adenoviruses. In: RICHMAN, D. D.; WHITNEY, R. J.; HAYDEN, F. G. **Clin Virol Churchill**, Livingstone, p. 525-547. 1997.

RUSSEL, W. C. Adenoviruses: update on structure and function. **J. Gen. Virol.**, 90: 1-20, doi: 10.1099/vir.0.003087-0. January 2009.

SADERI, H., ROUSTAI, M. H., SABAH, F., SDEGHIZADEH, M., OWLIA, P., DE JONG, J. C. Incidence of enteric adenovirus gastroenteritis in Iran Children. **J. Clin. Virol.**, 24 (1-2): 1-5, 2002.

SANTOS, N. S. O.; SOARES, C. C. Viroses Entéricas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V. et al. **Introdução a Virologia Humana**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.59-74. 2008.

SANTOS, N. S. O.; SOARES, C. C. Virologia Clínica: viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V. et al. **Virologia Humana**, Guanabara Koogan. 3ª ed: p. 209-215. 2015.

SANTOS, G, E. O. Cálculo amostral: calculadora on-line. Disponível em: <<http://www.glaubersantos.com/calculoamostral.html>>. Acesso em: 23/03/2016.

SANTOSHAM, M.; CHANDRAN, A.; FITZWATER, S.; FISCHER-WALKER, C.; BAQUI, A. H.; BLACK, R. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. **Lancet**: 376:63-7. 2010.

SDIRI-LOULIZI, K.; GHARBI-KHELIFI, H.; DE ROUGEMONT, A.; HASSINE, M.; CHOUCANE, S.; SAKLY, N.; POTHIER, P.; GUÉDICHE, M. N.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. **J Med Virol**. Nov;81(11):1895-902, 2009.

SETH, P; ROSENFELD, M.; HIGGINBOTHAM, J.; CRYSTAL, R. G. Mechanism of enhancement of DNA expression consequent to cointernalization of a replicationdeficient adenovirus and unmodified plasmid DNA. **J Virol**, 68, 933–940, 1994.

SHENK, T. E. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPP, D. M.; HOWLEY, P. M, editors. **Fields Virology**. Philadelphia: LippincottRaven Publishers; Chapter 67. 1996.

SHOJA, Z; JALILVAND, S.; MOLLAEI-KANDELOUS, Y.; Validi, M. Epidemiology of viral gastroenteritis in Iran. **Pediatr Infect Dis J**. Feb: 33(2):218-20. doi: 10.1097/INF.000000000000028. 2014.

SHOKROLLAHI, M. R.; NOORBAKSH, S; MONAVARI, H. R.; DARESTANI, S. G.; MOTLAGH, A. V.; NIA, S. J. Acute Nonbacterial Gastroenteritis in Hospitalized Children: A Cross Sectional Study. **Jundishapur J Microbiol**. 7(12): e11840. 2014.

SILVA, P. A.; STARK, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; REITHER, K.; WEITZEL, T.; IGNATIUS, R.; SAAD, E.; SEIDU-KORKOR, A.; BIENZLE, U.; SCHREIER, E. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. **J Med Virol**. Oct;80(10):1790-8, 2008.

SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R. B.; NOZAWA, C. M.; LINHARES, R. E.; SANTOS, N. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **Journal of Clinical Virology**, 23: 171-177, 2002.

SPADA, P. K. P., TEIXEIRA, D.M., GURJÃO, T.C.M., ARAGÃO, G.C., SIQUEIRA, J.A.M., SOARES, L.S., OLIVEIRA, D.S., MASCARENHAS, J.D.P., SÁ, L.L.C., GABBAY, Y.B. Presença de adenovírus em amostras ambientais coletadas na cidade de Belém-pa, Brasil., 2011. XLVII **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical: doenças tropicais e centros urbanos**. Natal, 2012.

SPADA, P. K. P.; ARAGÃO, G. C.; TEIXEIRA, D. M.; KAIANO, J. H. L.; LIMA, I. C.G.; OLIVEIRA, D. S. et al. Molecular detection of adenovirus in stool from a semi-isolated african-descendant community in Ananindeua city, Pará State, Brazil. **Virus Reviews & Research** – Journal of the Brazilian Society for Virology. XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, 01 a 04 de setembro de 2013. Porto Seguro, BA. 2013.

TATE, J.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, D.; DUQUE, J. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5). 2011a.

THÖRNER, P. A.; AHREL-ANDERSSON, M.; HIERHOLZER, J. C.; JOHANSSON, M. E. Characterization of two divergent adenovirus 31 strains. **Arch Virol**; 133(3-4):397405, 1993.

TOPOROVISKI, M. S.; CHIEFFI, P. P. et al. Diarréia aguda em crianças menores de três anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparadas à de grupo controle. **Jornal de Pediatria**, v.72, n.2, p.97-104. 1999.

TRENTIN, J. J.; YABE, Y.; TAYLOR, G. The quest for human cancer virus. **Science**, v.137, set 14, p.835-41. 1962.

UNICEF: The United Nations Children's Fund. Countdown to 2015: maternal, newborn and child survival. Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report. New York, NY: **UNICEF**. 2008.

VESIKARI, T.; MATSON, D. O; DENNEHY, P.; VAN DAMME, P. et al. Safety and Efficacy of a Pentavalent Human–Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. **The new England Journal of medicine**. DOI: 10.1056/NEJMoa052664. January 5, 2006.

WICKHAM, T. J.; MATHIAS, P.; CHERESH, D. A.; NEMEROW, G. R. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, 73: 309–319, 1993.

WILHELMI, I., ROMAN, E., SANCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infect.**, 9 (4): 247-62, 2003

WHITELAW, A., DAVIES, H.; PARRY, J. Electron microscopy of fatal adenovirus gastroenteritis. **Lancet.**, 1: 361, 1977.

WHO (World Health Organization). The World health report: 2003: shaping the future. **Global Health: today's challenges**, Chapter 1. Geneva: WHO, p. 3-22. 2003.

WOLD, W.; HORRWITZ, M. S. Adenoviruses. IN: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. ed.5: Lippincott-Williams & Wilkins. 2007.

WOLD, W. S. M.; ISON, M. G. Adenoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. ed 6: Cap 56: 1732-1762. 2013.

9. ANEXO A



Parecer de Aprovação nº 0034/2011
Protocolo CEP/IEC - Nº 0013/2011
CAAE: 0013.0.072.000-11

Ananindeua/PA, 17 de outubro de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Prevalência de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave na cidade de Belém, Pará”


Pesquisador Responsável: ALEXANDRE DA COSTA LINHARES

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC