



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

SAMUEL ARRUDA RODRIGUES PEREIRA

**ADENOVÍRUS EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
INFANTIS EM FORTALEZA-CE, DE 2001 A 2013**

FORTALEZA/CE

2014

SAMUEL ARRUDA RODRIGUES PEREIRA

**ADENOVÍRUS EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
INFANTIS EM FORTALEZA-CE, DE 2001 A 2013**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Microbiologia Médica e Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Edna Araújo Moura

FORTALEZA/CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- P495a Pereira, Samuel Arruda Rodrigues.
Adenovirus em Infecções Respiratórias Agudas Infantis em Fortaleza-CE, de 2001 a 2013./ Samuel Arruda Rodrigues Pereira. – 2014.
83 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.
Orientação: Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura.
1. Adenovirus Humanos. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Infecções Respiratórias. I. Título.

CDD 618.922

SAMUEL ARRUDA RODRIGUES PEREIRA

**ADENOVÍRUS EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS INFANTIS EM
FORTALEZA-CE DE 2001 A 2013**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Microbiologia Médica e Animal.

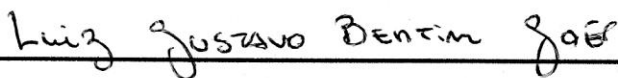
Data da Defesa 15 / 07 / 2014

BANCA EXAMINADORA



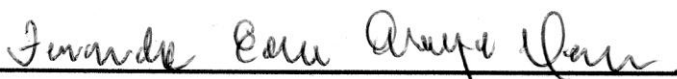
Prof.ª Dr.ª Sonia Mara Raboni

Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Dr. Luiz Gustavo Bentim Góes

Universidade São Paulo (USP)



Prof.ª Dr.ª Fernanda Edna Araújo Moura (Orientadora)

Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradeço a minha mãe, por está comigo desde o início desta longa caminhada.

Aos meus amigos, Mário Sidney e Eliclécio Rodrigues pelo companheirismo.

Bruno Jaeger pela iniciação na microbiologia.

A minha companheira na ciência e na vida, te amo Carol.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª Fernanda Edna Araújo Moura, por todas as lições dadas e a preocupação na formação de seus orientandos.

Ao Prof. Dr. José Julio Costa Sidrim, por ser um grande entusiasta da microbiologia no Ceará e fundador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

À Prof^ª. Dr^ª Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, atual coordenadora do de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela atenção dada aos pós-graduandos.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos passados.

À Prof^ª Dr^ª. Charlotte Marianna Hársi, Coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus da Universidade de São Paulo (USP), por nos fornecer toda a estrutura necessária para a execução deste trabalho.

À Dr^ª. Juliana Cristina Marinheiro, por transmitir seus conhecimentos sobre a análise molecular dos adenovírus.

A todos os estagiários do Laboratório de Virologia da UFC, por contribuírem na coleta de dados e amostras utilizadas neste estudo.

A todos os profissionais do Hospital Infantil Albert Sabin pela atenção e cuidados com as crianças atendidas neste hospital.

Às crianças e aos pais que participaram deste estudo.

À CAPES pelo suporte financeiro por meio da manutenção da bolsa de mestrado.

Quem estuda e não pratica o que aprendeu, é como
o homem que lava e não semeia.

Provérbio Árabe

RESUMO

O adenovírus humano (ADVh) é um agente viral comumente relacionado a infecções do trato respiratório, tanto superior quanto inferior, principalmente em crianças com idade inferior a cinco anos. Os ADVh são classificados em sete espécies (A-G) e divididos em 54 tipos. A proteína hexon é a principal responsável pela variação antigênica inter e intragrupos desse vírus. O objetivo desse estudo foi caracterizar os períodos de circulação e a diversidade de espécie e tipos de ADVh encontrados em Fortaleza, Ceará – Brasil, durante 150 meses consecutivos (janeiro de 2001 a junho de 2013). A imunofluorescência indireta (IFI) foi utilizada para a detecção dos ADVh, vírus sincicial respiratório, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3, já a imunofluorescência direta (IFD) foi utilizado na detecção do metapneumovírus humano (MPVh). A PCR e *Nested-PCR* seguida do sequenciamento das seis primeiras regiões hipervariável do gene *Hexon* foram utilizadas para caracterizar as espécies e tipos dos ADVh. Os ADVh foram detectados 290 (3,41%) das 8.517 amostras, sendo 60 (20,69%) destas encontradas em coinfeção com um, dois ou três vírus. Um total de 190 (65,52%) ADVh foram molecularmente caracterizados, sendo 162 pertencente à espécie ADVh-B (85,72%), 21 à ADVh-C (11,11%) e 6 à ADVh-E (3,17%), ficando um cepa sem identificação. As espécies circularam durante todo o período analisados sendo observado o predomínio da espécie B em quase todos os anos. Sete diferentes tipos foram identificados circulando em Fortaleza durante o período analisado. Os tipos predominantes foram o 3 (67,73%) e o 7 (17,80%). O ADVh-3 foi encontrado em todos os anos, já o ADVh-7 não foi observado nos anos de 2006, 2010 e 2011. Somente em 2011 todos os tipos identificados da espécie C circularam, e o único representante da espécie E, o ADVh-4, começou a ser identificado na nossa população apenas a partir de 2007. O melhor conhecimento da circulação de ADVh poderá ser alcançado se a vigilância for contínua e associada ao uso de métodos de maior sensibilidade na detecção desses vírus.

Palavra chave: Adenovírus Humano; Epidemiologia Molecular; Caracterização dos ADVh

ABSTRACT

Human adenovirus (HAdV) is commonly viral agent associated with infections of the respiratory tract, both upper and lower, mainly in children under the age of five. HAdV are classified into seven species (A-G) and divided into 54 types. Hexon protein is primarily responsible for inter-and intra-group antigenic variation of the virus. The aims of this study were to characterize the periods of circulation and the diversity of species and types of HAdV found in Fortaleza, Ceará - Brazil, for 150 consecutive months (from January 2001 to June 2013). Indirect immunofluorescence assay (IFA) was used for the detection of HAdV, respiratory syncytial virus, influenza A and B, parainfluenza virus 1, 2 and 3; and direct immunofluorescence assay (DFA) was used for detection of human metapneumovirus (HMPV). PCR and nested PCR followed by sequencing the six hypervariable regions of the hexon gene were used to characterize the species and types of HAdV. HAdV were detected 290 (3.41%) of the 8,517 samples, 60 (20.69%) of those found in coinfection with one, two or three viruses. A total of 190 (65,52%) HAdV were molecularly characterized: 162 HAdV belonging to species B (85.72%), 21 to HAdV- C (11.11%) and 6 to HAdV-3 (3, 17%), getting a strain without identification. The species circulated throughout the period the predominance of species B in almost all years analyzed. Seven different types were identified circulating in Fortaleza during the analysis period. The predominant types were 3 (67.73%) and 7 (17.80%). HAdV-3 was found in all the years and the HAdV-7 was not observed in years 2006, 2010 and 2011. Only in 2011, all kinds of species identified C circulated, and the only representative of the species and the HAdV- 4, began to be identified in our population only from 2007. Better understanding of the circulation of HAdV can be achieved if the monitoring is continuous and associated with the use of methods of greater sensitivity in the detection of these viruses.

Keyword: Human adenovirus; Molecular epidemiology; Characterization of HAdV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distância filogenética entre os membros do gênero <i>Mastadenovirus</i> . O calculo da distância foi feito com base nas sequências de aminoácidos do hexon.....	19
Figura 2 – (A) Representação esquemática de uma partícula de adenovírus; (B) – Separação das proteínas do adenovírus em gel de SDS-PAGE.....	21
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do ADVh-2, regiões de transcrição e genes.....	23
Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de replicação dos ADVh.....	24
Figura 5 - Distribuição mensal das infecções respiratórias agudas, detecção de ADVh e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001- 2013).....	43
Figura 6 – Distribuição acumulada por mês dos ADVh positivas e das IRA totais entre 2001 e 2013.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição das espécies, tipos e tropismo dos ADVh.....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> direcionados à região do Hexon do genoma adenoviral, utilizados para identificação das espécies e sorotipos dos adenovírus detectados.....	37
TABELA 2 - Caracterização da população de estudo comparando crianças ADVh positivas e negativas entre 2001 e 2013 (N= 8.517).....	39

TABELA 3 – Coinfecções dos ADVh entre 2001 e 2013.....	41
TABELA 4 - Caracterização e distribuição das amostras analisadas por ano de estudo (2001-2013).....	42
TABELA 5 - Distribuição em espécies dos ADVh detectados no estudo e analisados por sequenciamento do gene hexon.....	45
TABELA 6 - Caraterização das espécies e tipos de ADVh circulantes em crianças com IRA atendidas no HIAS em Fortaleza entre 2001 e 2011 (n=7524).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ADVh - Adenovirus humano

ANF - Aspirados de nasofaríngeo

CAR - Coxsackievirus e adenovirus receptor

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FLU- Influenza

HIAS - Hospital Infantil Albert Sabin

HVR – Região hipervariável

IFI - Imunofluorescência Indireta

IRA - Infecções respiratórias agudas

IVAS - Infecções de vias aéreas superiores

MEM-E - Meio Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle

MHC - Complexo de histocompatibilidade

MPV – Metapneumovirus

OD - *Odds ratio*

OMS - Organização Mundial da Saúde

BP – Pares de Base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RGD - Arginina-Glicina-Aspartato

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

SDS - Lauril sulfato de sódio

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*

TE – Tampão Tris-EDTA

TP - Proteína terminal

VSR - Vírus sincicial respiratório

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2. 1. Histórico.....	17
2. 2. Características do Vírus.....	18
2.2.1. Classificação.....	18
2.2.2. Estrutura dos Adenovírus.....	20
2.2.3. Organização Genômica.....	22
2.2.4. Replicação Viral.....	23
2.2.5. Patogênese e Resposta Imunológica do Hospedeiro.....	25
2.3. Epidemiologia.....	26
2.4. Principais Síndromes Clínicas.....	27
2.4.1. Infecções Respiratórias Agudas.....	27
2.4.2. Gastroenterites.....	28
2.4.3. Conjuntivite.....	28
2.5. Diagnóstico Laboratorial.....	29
2.6. Prevenção.....	30
2.7. Tratamento.....	30
2.8. Pergunta de Partida.....	32

2.9. Hipóteses.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Descrição do Estudo.....	34
4.1.1. Tipo de estudo.....	34
4.1.2. População e Local do Estudo.....	34
4.1.3. Aspectos Éticos.....	34
4.1.4. Coleta de Dados e de Material Clínico.....	35
4.2. Diagnóstico Laboratorial.....	35
4.2.1. Coleta e Processamento das Amostras.....	35
4.2.2. Imunofluorescência.....	35
4.3. Tipagem Molecular dos ADVh.....	36
4.3.1. Extração do DNA Viral.....	36
4.3.2. PCR e <i>Nested</i> -PCR para Amplificação da Região do Hexon.....	37
4.3.3. Sequenciamento do Gene Hexon.....	38
4.3.4. Edição e Análise das Sequências.....	38
4.4. Análise Estatística.....	38

5. RESULTADOS	39
5.1. Caracterização da População de Estudo.....	39
5.2. Distribuição das IRA no Período de Estudo.....	42
5.3. Sequenciamento das Regiões Hipervariáveis do Gene Hexon.....	44
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	
Anexo I – Parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin.....	75
Anexo II - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	76
Anexo III – Ficha Epidemiológica.....	78
APÊNDICE	79
Artigo.....	8

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRA) são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, especialmente entre as crianças menores de cinco anos, que podem apresentar quadros recorrentes de IRA durante o ano (ARNOLD *et al.*, 2006; SLOOTS *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as infecções respiratórias seriam a segunda maior causa de mortes nesta faixa etária (BRYCE *et al.*, 2005), somente em 2011 as IRA foram responsáveis por mais de 640 mil mortes na população com idade inferior a cinco anos (WHO, 2013). Apesar de apresentar taxas semelhantes de morbidade entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, 99% das mortes por IRA se concentram em países mais pobres principalmente na África Subsaariana e Sudeste da Ásia (CASHAT-CRUZ *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2013).

No Brasil, as IRA são responsáveis por cerca de 45% das hospitalizações e por 5,5% dos óbitos na população pediátrica. A variação da porcentagem de óbitos varia pouco conforme cada região, sendo os maiores percentuais encontrados no Norte (7,5%) e os menores no Sul (4,5%) (BRASIL, 2009).

Diversas classes de microrganismos podem funcionar como agentes etiológicos das IRA sendo os principais vírus e bactérias, tendo o primeiro como o principal agente deste tipo de infecção (SIMOES *et al.* 2006; TREGONING; SCHWARZE 2010). A taxa de detecção viral nessas infecções é bastante variável sendo encontrado entre 30,7% a 66,5% dependendo de fatores como, faixa etária, setor de atendimento, síndrome clínica, período de estudo e metodologia utilizada em sua identificação. Os vírus mais frequentemente encontrados nas IRA são o vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus humano (ADVh), influenza A e B, parainfluenza 1, 2, 3 e 4 (AHMED *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2012; BICER *et al.*, 2013 KHAMIS *et al.*, 2012).

Os ADVh são importantes agentes etiológicos nas IRA, podem ser encontrados entre 2% e 27% destas infecções (BICER *et al.*, 2013; LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2007a). Os quadros clínicos causados por este vírus podem variar na sua forma de apresentação, sendo desde um resfriado até a uma pneumonia fatal (TANG *et al.*, 2013). As causas destas variações ainda não estão bem esclarecidas. Contudo, parece que as epidemias de infecções respiratórias graves por ADVh estão associadas a determinados sorotipos emergentes (CDC, 2007; LAI *et al.*, 2013). A determinação dos tipos de ADVh circulantes em uma determinada região tem importância clínica e

epidemiológica, pois cada um destes pode estar relacionado com epidemias e com manifestações clínicas mais graves, o que possibilitaria, em uma análise mais específica, determinar o prognóstico e orientar a terapêutica adotada nos casos de IRA em pacientes com infecção por ADVh (CARR *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2009). Neste contexto, este estudo vem para aprimorar o conhecimento sobre o perfil clínico-epidemiológico das IRA associadas aos ADVh, onde em um período de 150 meses (janeiro de 2001 a julho de 2013) foi analisado o impacto dos ADVh nas IRA em crianças atendidas em um hospital pediátrico de referência e sendo este o primeiro estudo a caracterizar molecularmente as espécies e tipos de ADVh circulantes em Fortaleza. Contudo, devido a dificuldades na inclusão das amostras coletadas entre 2012 e 2013 nesta etapa, somente as cepas de ADVh detectadas de 2001 a 2011 tiveram sua espécie e tipos identificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Os adenovírus humanos (ADVh) foram descritos pela primeira vez em 1953 por Rowe e colaboradores quando tentavam estabelecer uma linhagem celular de tecido adenoide removido cirurgicamente de crianças com quadro febril, foi observado o fenômeno de degeneração destas culturas resultante da replicação agente não identificado no presente tecido. Em 1954, Hilleman e Werner, investigando uma de doença respiratória em recrutas, descreveram um agente similar, que induzia alterações citopáticas em cultura de células humanas. Esses vírus inicialmente recebeu diversas nomenclaturas como: *adenoid degeneration* (AD), *adenoid-pharyngealconjuntival* (APC) e *acute respiratory disease agents* (ARD). Apenas em 1956, Enders e colaboradores criaram a denominação atual de adenovírus, devido ao tecido no qual foram descobertos.

Em 1962, Trentin e colaboradores descreveram, pela primeira vez, um vírus humano capaz de induzir tumores malignos quando inoculado em hamsters recém-nascidos, o sorotipo ADVh-12 foi o primeiro vírus descoberto com capacidade oncogênica. Contudo, não existem evidências epidemiológicas da associação deste vírus a tumores humanos, pois diversos estudos falharam na tentativa de detectar o ácido nucleico do ADVh-12 nestes tumores (GREEN *et al.* 1980; MACKEY *et al.* 1976).

Durante a segunda metade do século XX, os adenovírus tornaram-se um importante modelo de elucidação dos aspectos fundamentais da expressão gênica em células de mamíferos, sendo sua maior contribuição à descoberta do *splicing* de RNA mensageiro (mRNA) (WOLD; HORWITZ, 2007). Os adenovírus vêm se demonstrando um eficiente vetor para transferência gênica, com aplicações na terapia gênica, tratamento do câncer e desenvolvimento de vacinas (CUSACK, 2005; KIM *et al.* 2012).

2.2. Características do Vírus

2.2.1. Classificação

Os ADVh pertencem à família *Adenoviridae* do gênero *Mastadenovirus*, que além do vírus humanos encontramos adenovírus que infectam outros mamíferos como: símios e bovinos. Os ADVh estão atualmente classificados em 54 sorotipos divididos em sete espécies (A-G), sendo classificados de acordo com características antigênica, morfológicas e moleculares (HARRACH *et al.*, 2011; WOLD; HORWITZ, 2007). A atual classificação dos *Mastadenovirus* está representada na Figura 1.

A primeira forma de classificação dos ADVh foi proposta por Rosen *et al.* em 1960 e era baseada na aglutinação de hemácias de ratos e de macacos *Rhesus*. Em seguida, Huebner *et al.* (1965) sugeriram a divisão dos ADVh em grupos que se baseava na patogenicidade e oncogenicidade em hamsters recém-nascidos. Posteriormente em 1979, Wadell, com base no peso molecular dos polipeptídeos estruturais, propôs uma nova classificação para este vírus. Em 1980, Wadell e colaboradores analisando os padrões de restrição do genoma de diversos sorotipos após a ação da enzima *Sma* I, observou que o número de fragmentos era único em cada espécie e que sorotipos de uma mesma espécie apresentam vários fragmentos comigrantes.

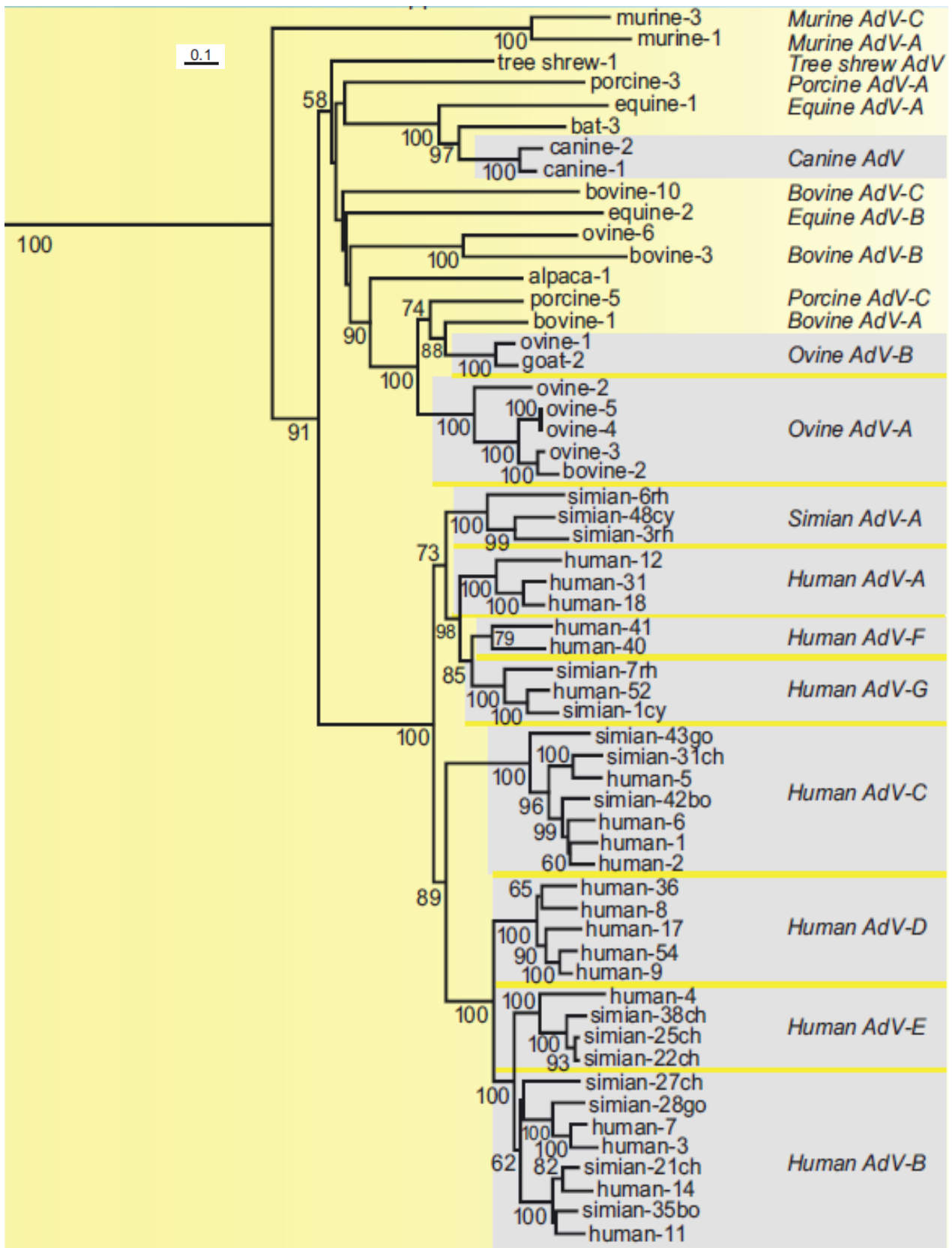


Figura 1- Distância filogenética entre os membros do gênero *Mastadenovirus*. O calculo da distância foi feito com base nas sequências de aminoácidos do *hexon*. Fonte: HARRACH *et al.*, 2011.

2.2.2. Estrutura dos Adenovírus

O vírion dos ADVh são compostos por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica com diâmetro que varia 70-90nm. São vírus que não possuem envelope com DNA linear de fita dupla. Seu capsídeo é composto de 240 capsômeros (*hexon*) e 12 vértices (*penton*), formados das proteínas *penton* base e fibra (Figura 2A) (HARRACH *et al.*, 2011).

A partícula viral é constituída de 11 proteínas, denominadas polipeptídios (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VII, IX, X e TP) sendo esta nomenclatura atribuída a capacidade de migração de cada uma destas proteínas em gel de poliacrilamida, conforme observado na figura 2B (HARRACH *et al.*, 2011; VELLINGA; VAN der HEIJDT; HOEBEN, 2005).

A proteína hexon (pII) é o principal componente do capsídeo dos ADVh responsável por cerca de 63% da massa total de proteína deste vírus. O tamanho desta partícula pode variar conforme cada sorotipo, sendo a maior encontrada no ADVh-2 com 967 aminoácidos. Cada hexon possui até nove regiões hipervariáveis, sendo estas associadas à determinação dos sorotipos e alvo da ação de anticorpos neutralizantes (RUSSELL, 2009; SAN MARTÍN, 2012; RUX; BURNETT, 2004). Até 2008, se acreditava que único papel do *hexon* era de formação do capsídeo, mas foi observada a capacidade das regiões hipervariáveis desta proteína de interagir com fator de coagulação X, atribuindo-lhe um papel no tropismo, ligação a receptores e na penetração, características anteriormente exclusivas das proteínas do *penton* (KALYUZHNIY *et al.*, 2008; WADDINGTON *et al.*; 2008).

O *penton* é formado da ligação covalente de duas proteínas: a *penton* base (pIII) e fibra (pIV) e tem um papel chave nos estágios iniciais da infecção. Estas proteínas são responsáveis pela ligação (fibra) e pela internalização (*penton* base) dos vírus na célula hospedeira (RUSSELL, 2009; SAN MARTÍN, 2012). A *penton* base possui dois domínios, o superior conhecido com RGD, este nome é devido aos aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato que o compõem, é responsável por interagir com moléculas da superfície da célula hospedeira e ativar a permeabilidade celular e penetração do vírus (RUX; BURNETT, 2004).

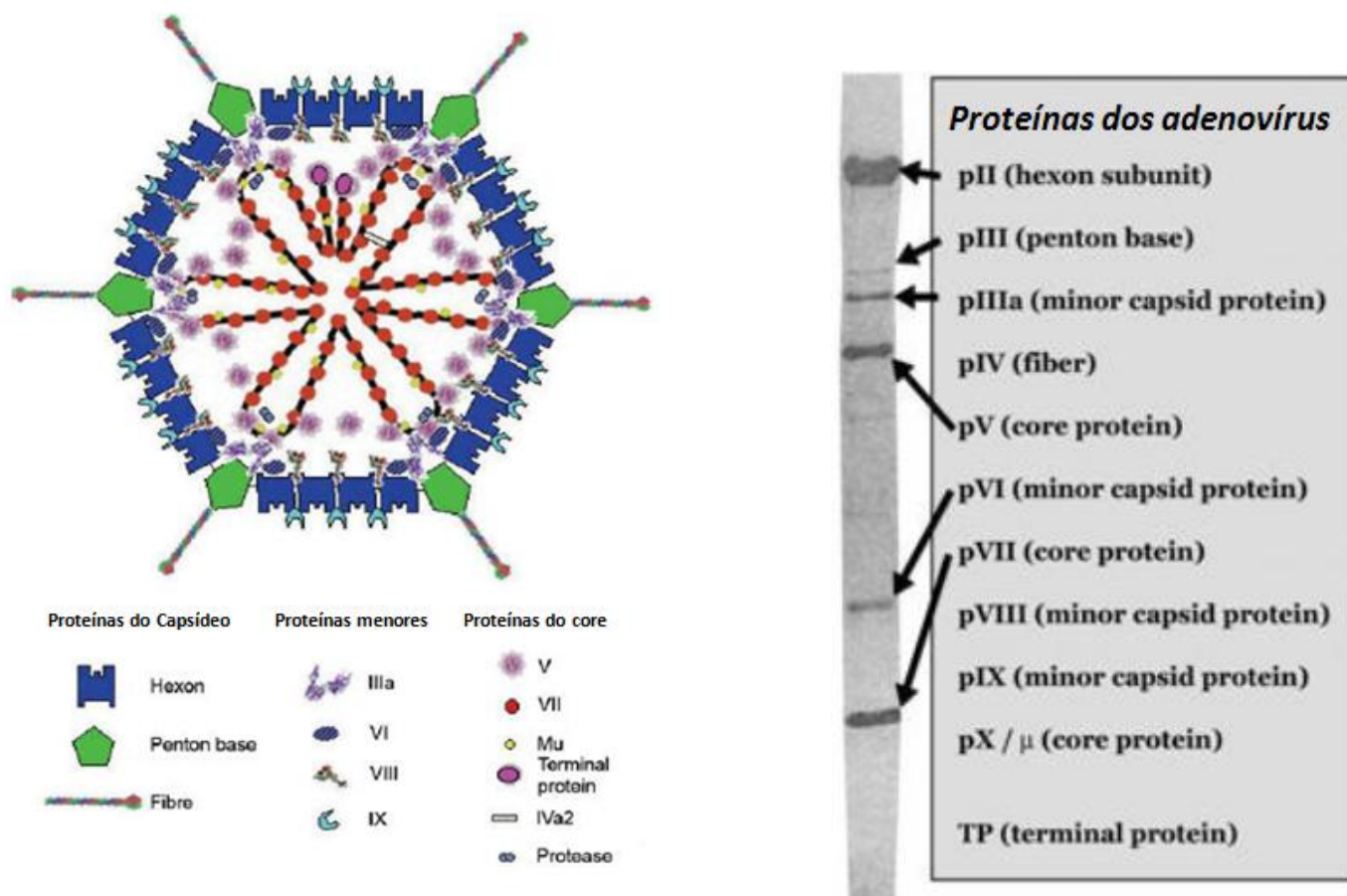


Figura 2 – (A) Representação esquemática de uma partícula de adenovírus; (B) – Separação das proteínas do adenovírus em gel de SDS-PAGE. Fonte: RUSSEL, 2009 e WADELL *et al.*, 1980.

A arquitetura da fibra em todos os ADVh é semelhante: porção N-terminal ligada a *penton* base, sendo esta altamente conservada entre os sorotipos; uma haste central constituída de um número variado de β -repetições e cada repetição pode conter de 15 a 25 aminoácidos, e finalmente a região globular da porção C-terminal que é responsável pela ligação inicial do vírus ao receptor celular CAR (Coxsackievirus e adenovírus receptor). Grande parte da sequência de aminoácidos da fibra é bastante variável e acarreta em variações antigênicas entre os diversos sorotipos de ADVh (NICKLIN *et al.* 2005; RUSSELL, 2009; SAN MARTÍN, 2012; TARASSISHIN *et al.* 2000).

A proteína pIIIa está localizada abaixo da *penton* base, sendo sua porção N-terminal, região altamente helicoidal, ligada a *penton* base, ao hexon e proteína pVI. Mutações nesta proteína formam partículas virais deficientes, sendo o papel desta

associada à estabilidade dos vértices e do genoma após a montagem das partículas (MA; HEARING, 2011; SABAN *et al.*, 2006). A proteína pVI tem múltiplas funções durante a infecção pelo ADVh, sendo relacionado a penetração viral, alterando a membrana do endossoma, a montagem, auxiliando no transporte das partículas hexon recém sintetizadas, e estrutura das partículas virais (WIETHOFF *et al.*, 2005; WODRICH *et al.*, 2003; MANGEL *et al.*, 1996).

A proteína pVIII é provavelmente de função menos entendida. Mutações defectivas nesta proteína têm gerado mutantes termolábeis, o que sugere a participação desta na estabilidade do *vírion* (LIU *et al.* 1985). A proteína pIX assim com pVIII participa da estabilização do capsídeo, mas esta é exclusiva dos *Mastadenovirus* (RUSSELL, 2009).

No *core* viral associado ao DNA viral se encontram quatro proteínas: a TP (proteína terminal, do inglês *terminal protein*) que se encontra ligada à extremidade 5' do DNA tendo função de iniciador da replicação do mesmo; A pVII desempenha a função de histona, compacta e organiza o material genético do vírus no interior do capsídeo; A pV ancora o DNA viral a proteína *penton base*; A pX é clivada em proteína *mu*, mas sua função continua desconhecida (CHATTERJEE *et al.*, 1986; SAN MARTIN; BURNETT, 2003; RUSSELL, 2009).

2.2.3. Organização Genômica

Todos os ADVh possui o genoma composto por uma dupla fita de DNA linear com uma repetição terminal invertida (ITR-*inverted terminal repetition*) podendo estas sequências variarem entre 36 e 371 pares de base (bp) e dependendo do sorotipo o tamanho da cadeia de DNA também varia ficando entre 26,163 e 48,395 bp (HARRACH *et al.*, 2011).

Os ADVh são capazes de codificar mais de 40 diferentes proteínas e em sua maioria graças ao seu mecanismo de *splicing*. Contudo, existem apenas oito unidades de transcrição dependentes da RNA polimerase II, sendo cinco de transcrição precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas de transcrição intermediária (pIX e pIVa2) e uma unidade de transcrição tardia principal (MLTU- *Major Late Transcription Unit*) que processa cinco famílias de RNAm (L1, L2, L3, L4 e L5). Os ADVh possuem ainda um ou dois VA-RNA, dependendo da espécie, que são sintetizados pela RNA polimerase

III (HARRACH *et al.*, 2011; WOLD; HORWITZ, 2007). A figura 3 representa de forma esquemática o genoma dos *Mastadenovirus*.

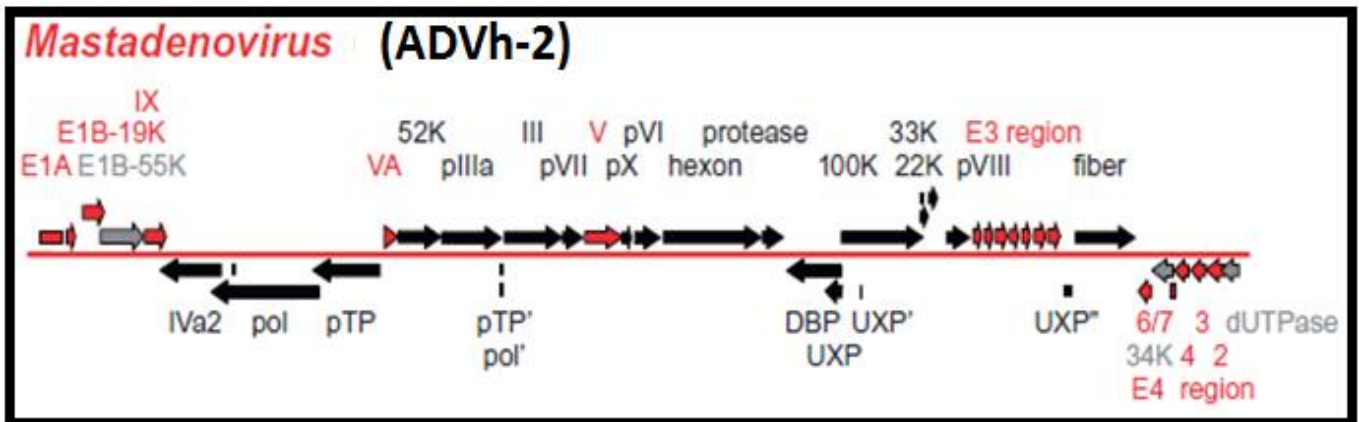


Figura 3 – Representação esquemática do genoma do ADVh-2, regiões de transcrição e genes. Fonte: HARRACH *et al.*, 2011.

Os genes de transcrição precoce expressam proteínas moduladoras das funções celulares, facilitando a replicação do DNA viral e a transcrição dos genes tardios, já as expressas de forma tardia desempenham função estrutural (WOLD; HORWITZ, 2007).

2.2.4. Replicação Viral

O ciclo replicativo dos ADVh é mais estudado nos tipos 2 e 5, pela facilidade destes se replicarem em cultura de células. Por convenção, a replicação destes vírus é dividida em duas fases: os eventos precoces que tem início logo após interação do vírus com receptores da célula hospedeira, e incluem as etapas de adsorção, penetração, transcrição e tradução de um conjunto inicial de genes; e a fase tardia do ciclo começa juntamente com o início da replicação do DNA viral, sendo expresso um novo conjunto de genes virais tardios e montagem dos vírion recentemente formados (Figura 4) (WOLD; HORWITZ, 2007).

O processo de infecção se inicia com a formação de um complexo de alta afinidade entre o domínio C-terminal presente na fibra e um receptor presente na superfície celular. Philipson *et al.* (1968) foram os primeiros a demonstrar o papel da fibra (pIV) como mediadora da ligação do vírus a célula hospedeira, mas somente em 1997, foi descoberto que a proteína da membrana celular 46-kDa, conhecida como CAR, era o receptor celular para a maioria dos ADVh (exceto a espécie B e alguns

sorotipos da espécie D). Os receptores celulares CD46 e ácido siálico foram identificados como receptores dos sorotipos da espécie B e dos ADVh-8, 19 e 37 (espécie D) respectivamente (BERGELSON *et al.* 1997; SMITH *et al.*, 2010; TOMKO *et al.* 1997; ARNBERG *et al.* 2002). A internalização do vírus ocorre pelo processo de endocitose, com a ruptura do endossoma pela ligação do domínio RGD da *penton* base às integrinas modificando a matrix extracelular e permitindo sua liberação e depois, o DNA viral é transportado até o núcleo celular (SMITH *et al.*, 2010; WOLD; HORWITZ, 2007). No núcleo, o genes precoces são transcritos em RNAm e as proteínas produzidas serviram para iniciar a replicação viral e induzirem os genes tardios. Os genes tardios são transcritos em proteínas estruturais que são sintetizadas e iniciará o processo de morfogênese ambos os processos ocorrem no citoplasma, mas a etapa final da montagem de novas partículas, entrada do DNA replicado nos novos capsídeos, ocorrem no núcleo (WOLD; HORWITZ, 2007). A montagem das partículas é acompanhada de alterações da permeabilidade celular (proteína E3) e maturação do vírion pela proteína terminal para lhe dar estabilidade, posteriormente a membrana plasmática sofre o processo de lise e as novas partículas virais são liberadas (RUSSEL, 2000).

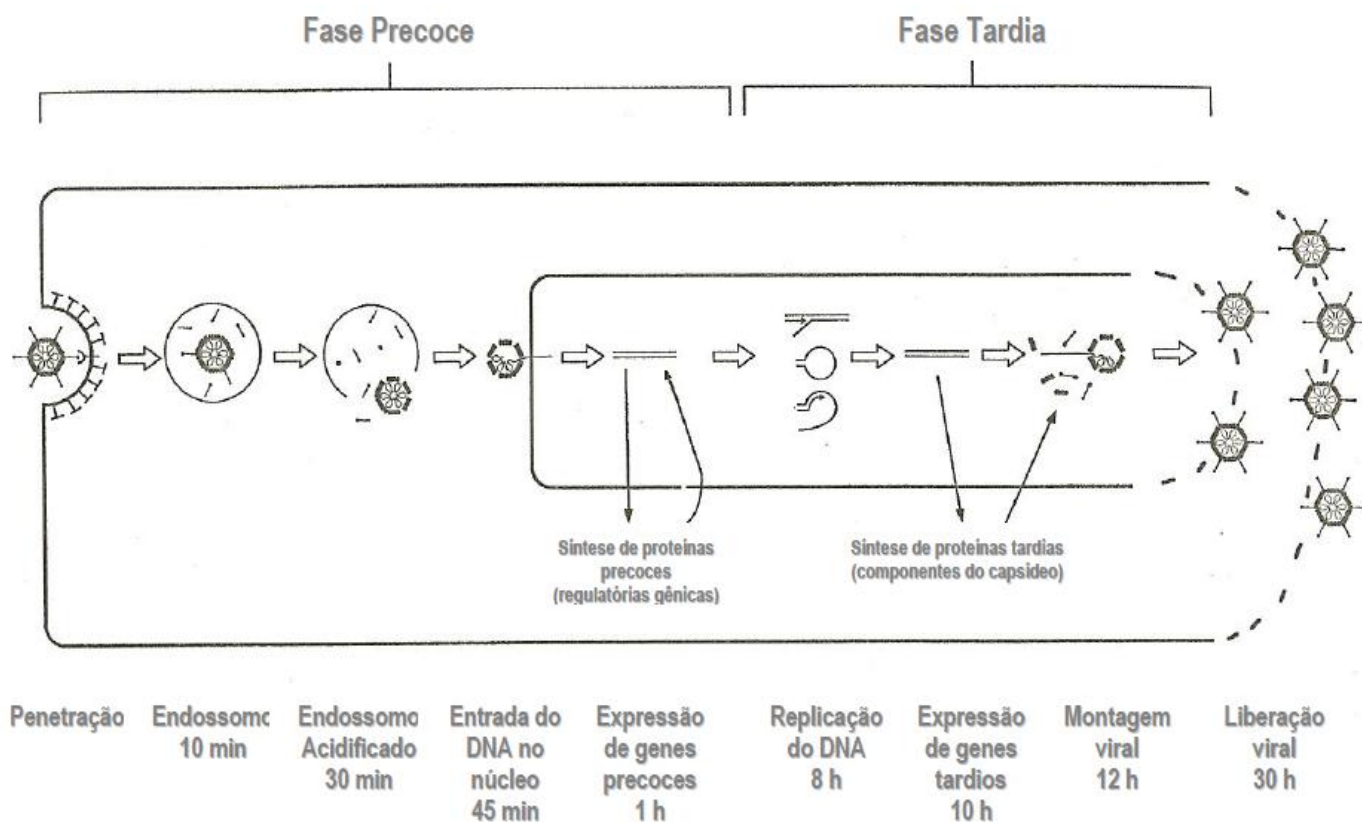


Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de replicação dos ADVh. Adaptado de RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997.

2.2.5. Patogênese Viral e Resposta Imunológica do Hospedeiro

Os ADVh são transmitidos por contato direto, através de secreções respiratórias na forma de aerossóis, secreções oculares e, no caso dos ADVh entéricos, pela via fecal-oral. O período de incubação médio deste vírus em quadros respiratórios é 6 dias, variando entre 4-8 dias. Os ADVh se replicam principalmente em células epiteliais do trato respiratório e gastrointestinal, sendo capazes de estabelecer infecção persistente ou latente em linfócitos. No trato respiratório, penetram pela nasofaringe se propagando pelas células do trato respiratório superior levando a destruição destas células e conseqüentemente, a necrose celular e a descamação do epitélio respiratório. Este processo pode se disseminar para outras partes do trato respiratório como: traqueia, brônquios, bronquíolos e pulmão, esta disseminação se dá célula a célula ou por viremia (LESSLER *et al.*, 2009; WOLD; HORWITZ, 2007)

Em pacientes imunocomprometidos foram relatados casos graves de infecções por ADVh, mostrando o papel chave do sistema imunológico no controle das infecções por este vírus e que a ausência de uma resposta imunológica específica do hospedeiro pode levar a uma grande destruição celular. O sistema imunológico inato dispõe de diversos mecanismos para controlar a disseminação dos ADVh, como a capacidade de alguns células epiteliais de liberarem defensinas, peptídeos antimicrobianos, que tem ação protetora contra infecção por ADVh. Determinados tecidos ao receberem um estímulo apropriado irão secretar múltiplas quimiocinas que recrutaram neutrófilos que induzem uma resposta inflamatória (RUSSEL, 2000; WOLD; HORWITZ, 2007). Outros mecanismos da defesa inata são o recrutamento de macrófagos, ativação do sistema complemento e as células *natural killer*, estes mecanismos desempenham um importante papel no controle das infecções pelos ADVh (RUSSEL, 2000). Durante o processo infeccioso deste vírus, uma rápida resposta imune adaptativa é montada e ocorre como resultado da interação do vírus com a célula hospedeira independente da transcrição de algum gene viral (RANDALL; GOODBOURN, 2008; RUSSEL, 2000).

As repostas adaptativas do hospedeiro, tanto a celular como a humoral, são estimuladas pelo hexon viral. Cada hexon possui até nove regiões hipervariáveis, sendo estas associadas a determinados sorotipos e são alvos de anticorpos neutralizantes (SAN MARTÍN, 2012; SUMIDA *et al.* 2005). A resposta celular é efetuada basicamente por linfócitos T_{CD8} (citotóxicos) e T_{CD4} (auxiliares). O T_{CD8} atuam depois da exposição do hexon juntamente com complexo de histocompatibilidade ou MHC I (do inglês *major*

histocompatibility complex) liberando perforinas, proteínas que induzem a lise celular, já os linfócitos T_{CD4} estimulam a proliferação de linfócitos B formadores da resposta humoral (LEEN *et al.*, 2004; RUSSEL, 2000; WOLD; HORWITZ, 2007).

2.3. Epidemiologia

Os ADVh estão associados a síndromes clínicas envolvendo diversos sistemas como o respiratório, gastrointestinal e urinário (COOPER *et al.*, 2000; HIROI *et al.*, 2013, ROBINSON *et al.*, 2011). As espécies e tipos, assim como seu principais tecidos alvos estão apresentados no quadro 2. A incidência deste agente nas infecções virais de relevância clínica é cerca de 8% (GARCÍA *et al.* 2009; VORA *et al.* 2006). Nas últimas duas décadas, os ADVh tem emergido como importante patógeno em indivíduos imunocomprometidos, principalmente em pacientes transplantados. As infecções por este agente podem afetar até 40% dos pacientes infantis que receberam células tronco, e entre 5-10% dos transplantados de órgãos sólidos (HUMAR *et al.*, 2005; de MEZERVILLE *et al.*, 2006; TEBRUEGGE; CURTIS, 2012).

Quadro 1 - Distribuição das espécies, tipos e tropismo dos ADVh		
Espécie	Tipos	Tropismo
A	12, 18, 31	Trato gastrointestinal
B	3,7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Trato urinário e respiratório
C	1, 2, 5, 6	Trato respiratório
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39,42-49, 51, 53, 54	Conjuntiva e trato respiratório
E	4	Trato respiratório e conjuntiva
F	40, 41	Trato gastrointestinal
G	52	Trato gastrointestinal

Fonte: Adaptado de HARRACH *et al.*, 2011.

O ADVh tem importante papel nas IRA, principalmente em crianças com idade inferior a 5 anos, sua taxas de detecção varia entre 2 a 27% dependendo da população de estudo e da metodologia empregada para sua identificação (BICER *et al.* 2013; LUIZ *et al.* 2010; MOURA *et al.* 2007a). As espécies e seus respectivos sorotipos mais comumente associados as IRA são a espécie C (1, 2, 5 e 6); a B, que é dividida em subespécie B1 (3 e 7) e B2 (14) e a E (4) (AMPUERO *et al.* 2012; BARRERO *et al.* 2012; MOURA *et al.* 2007b; WANG *et al.* 2013). Incidências destes sorotipos podem

mudar conforme o local e a população avaliada, mas os sorotipos da espécie B são mais comumente associados a períodos epidêmicos e os da C endêmicos em determinadas regiões (GARCÍA *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2007b). Na Europa, estudos apontaram a prevalência da espécie C nas infecções respiratórias pediátricas, especialmente do ADVh-1 e 2. Contudo em outras regiões geográficas como a Ásia a prevalência do ADVh-3 foi observado (TABAIN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Os ADVh-3 e 7 foram identificados em surtos de infecção das vias aéreas inferiores (IVAI) em crianças, assim como em pacientes com insuficiência respiratória aguda de evolução fatal (KIM *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2013).

Estudo promovido em diversos países da América Latina encontrou ADVh-2 como tipo predominante com 54% das amostras. Contudo, trabalhos da Colômbia e Argentina observaram a maior prevalência da espécie B, ADVh-3 e 7 (BARRERO *et al.* 2012; GARCÍA *et al.*, 2009; ROJAS *et al.* 2012). No Brasil, os ADVh-2 e ADVh-7 foram os mais prevalentes em estudos promovidos na Região Sudeste do país. No único trabalho produzido na região Nordeste, sobre o tema, os sorotipos da espécie C foram os mais detectados (LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2007a; MOURA *et al.*, 2007b).

O ADVh-4, único representante da espécie E, foi relatado causando IRA na população pediátrica. Contudo, a população mais afetada por este sorotipo é a de recrutas militares em treinamento. As IRA são a maior causa de perda de treinamento nesta população, podendo evoluir para quadro de pneumonia em até 10% dos casos e menos frequentemente para o óbito. O ADVh-4 e ADVh-7 são historicamente associados a 80% da IRA e 20% das hospitalizações nesta população (LUIZ *et al.*, 2010; KOUCHNER *et al.*, 2013).

2.4. Principais Síndromes Clínicas

2.4.1. Infecções Respiratórias Agudas

As IRA são as manifestações clínicas mais comuns associados aos ADVh, tanto em pacientes adultos como em crianças, tradicionalmente os ADVh estão entre 5-15% destas infecções na população pediátrica. A maior parte dos indivíduos é exposta a este agente ainda na infância e pode se apresentar quadros clínicos na forma de faringites, inflamação das tonsilas, febre faringo-conjuntival, bronquiolites e pneumonias

(MOURA *et al.*, 2007b; WOLD; HORWITZ, 2007). A maior parte das IRA por ADVh se limitam ao trato respiratório superior e são chamadas de infecção das vias aéreas superiores (IVAS), os sintomas mais comuns associados a este síndrome são: a rinorréia, febre, conjuntivite e tosse sendo, normalmente, uma doença de curso benigno e autolimitadas. A gravidade e extensão dos sintomas vão depender da síndrome clínica e do sorotipo envolvido na infecção (KUNZ; OTTOLINI; 2010; WOLD; HORWITZ, 2007).

A febre faringoconjuntival foi a primeira síndrome clínica atribuída à infecção aguda pelo ADVh, o ADVh-3 foi associado a um surto desta doença em 1956. Estes surtos ocorrem tipicamente na população infantil principalmente em acampamentos de verão, orfanatos e escolas, sendo causado pela contaminação da água de piscinas e as condições de aglomeração nestes lugares (KUNZ; OTTOLINI; 2010; SOBEL *et al.* 1956). Os achados clínicos mais comuns desta infecção são: febre alta, faringite, retroauricular ou cervical linfadenopatia, seguido de uma conjuntivite folicular (KUNZ; OTTOLINI; 2010). A evolução destes quadros para uma bronquiolite ou pneumonia pode ocorrer. Contudo, é difícil diferenciar estas infecções daquelas causadas por outros agentes (TABAIN *et al.*, 2012).

2.4.2. Gastroenterites

Os ADVh são importantes patógenos entéricos, em estudo recente foi identificado em até 7,5% das amostras colhidas durante um surto de doença diarreica em Mumbai, Índia (CHITAMBAR *et al.* 2012). Os sorotipos mais associados às infecções entéricas são 40 e 41. Outros sorotipos associados à gastroenterites são ADV-3 e ADVh-31, mas seu papel neste tipo de infecção não está bem elucidada pois estes são capazes de se replicarem de forma eficiente no intestino, sendo continuamente excretado sem que haja doença diarreica. A diarreia pelo ADVh é mais comum em crianças menores que quatro anos e são normalmente acompanhada de febre e vômitos, e é dificilmente distinguível de uma infecção por outro vírus, exemplo rotavírus (WOLD; HORWITZ, 2007).

2.4.3. Conjuntivite

Os ADVh têm importante papel nas ceratoconjuntivites epidêmicas e sendo considerados um dos principais patógenos associadas a epidemias em pequenas

comunidades e surtos nosocomiais envolvendo adultos hospitalizados e unidades de tratamento intensivo de neonatais, sendo os sorotipos mais comuns neste tipo de infecção os ADVh-8, 19, 37. Os sintomas comumente relatados são: dor nos olhos, fotofobia, lacrimejamento e hiperemia conjuntival. O período de incubação do vírus fica entre 4 e 24 dias e normalmente a infecção é autolimitada, mas infecções persistentes foram relatadas em pacientes imunocomprometidos desenvolvendo uma ceratite profunda, com comprometimento da visão e danos significativos à córnea (KUNZ; OTTOLINI; 2010).

2.5. Diagnóstico Laboratorial

Nas infecções respiratórias, os materiais de escolha para isolamento e a detecção dos ADVh são o lavado ou *swab* de orofaringe, aspirado de nasofaringe e o lavado brônquico ou alveolar, lembrando que estes materiais devem ser coletados durante a fase aguda da infecção e acompanhados de dados clínicos. A identificação do ADVh pode ser feita pela cultura de células, detecção de antígenos e as técnicas moleculares (WOLD; HORWITZ, 2007).

A cultura celular é considerada o padrão-ouro no diagnóstico de muitos vírus, inclusive para os ADVh. Contudo, o tempo necessário para resultado definitivo pode ficar entre 5 e 6 dias, o que a torna de difícil aplicação na rotina clínica. Os imunoenaios como a imunofluorescência são mais baratos, rápidos e de fácil execução, tendo resultados em até poucas horas, mas uma séria limitação destas técnicas na detecção dos ADVh é sua baixa sensibilidade e especificidade, sendo necessário, por muitas vezes, a confirmação dos resultados por testes mais sensíveis e específicos como a cultura celular e o PCR (KUNZ; OTTOLINI; 2010; WOLD; HORWITZ, 2007).

As técnicas moleculares como PCR e o PCR *real-time* tem se demonstrado como uma opção para substituir as metodologias tradicionais de diagnóstico, pois são de rápida execução, com alta sensibilidade e especificidade, porém são metodologias ainda bastante caras e que exigem mão de obra especializada, tanto no momento de elaborar os testes como na sua interpretação (KUNZ; OTTOLINI; 2010; WOLD; HORWITZ, 2007). A capacidade dos ADVh de estabelecerem infecção latente subclínica dificulta a implicação deste agente como patógeno de fase aguda, mesmo com resultados positivos para sua presença.

As técnicas moleculares tem substituído a cultura celular também na identificação dos tipos de ADVh em determinadas infecções e estes novos métodos se baseiam na amplificação e sequenciamento das regiões hipervariáveis do gene *hexon* (HVR1 a HVR6) permitindo a identificação dos 54 sorotipos descritos até o momento (LU; ERDMAN, 2006).

2.6. Prevenção

Os ADVh devido a sua estrutura são bastante resistentes aos detergentes orgânicos e soluções alcoólicas, ao ressecamento e mudanças de temperatura e umidade e podem permanecer viáveis por vários dias em materiais de alumínio ou papel (BONNE e GERBA, 2007). Esta característica gera um impacto na elaboração de medidas de prevenção das infecções ocasionadas por este vírus. Além disso, possuem um longo período de incubação de 5 ou 6 dias, mas que pode se prolongar por 10 dias (LESSLER *et al.*, 2009). Isto contribui para a ocorrência de surtos em ambientes fechados com aglomeração de pessoas, por exemplo, em enfermarias e alojamento militar.

A importância dos ADVh tipos 4 e 7 causando infecções respiratórias em militares e a descoberta de que os mesmos vírus quando causavam gastroenterite estimulavam o sistema imune a produzir anticorpos específicos despertou o interesse em desenvolver uma vacina (HILLEMANN, 1958). Sua eficácia pode ser observada com a redução bastante significativa dos casos de infecções por ADVh (TOP *et al.*, 1971).

Em 1996, após 25 anos de vacinação, ocorreu um processo de descontinuidade na produção da vacina e o reflexo pode ser observado nos anos seguintes. De 1999 a 2004, foi observado em recrutas navais e da Força Aérea um índice anual de 1,2 e 1,35 casos a cada 100 recrutas/semana com um pico de atividade entre a terceira e quinta semana de treinamento (RUSSELL *et al.*, 2006). Somente em 2011, a vacina foi aprovada pelo *U. S. Food and Drug Administration* para militares com idade entre 17 e 50 anos. A vacina é recomendada pelo *U.S. Department of Defense* para recrutas militares em treinamento (CDC, 2011).

2.7. Conduta Terapêutica

A maioria das doenças causadas por ADVh são leves e tipicamente são tratadas com sintomáticos, como antitérmicos e glicocorticoides, não existindo terapia específica para estas infecções. Entretanto, algumas drogas como ribavirina e o cidofovir tem sido usado no tratamento de infecções mais graves em pacientes imunocomprometidos. As respostas destas drogas ainda são imprecisas, mas já demonstram algum sucesso (DAWOOD *et al.*, 2014; ULRYCH *et al.*, 2011; MYNAREK *et al.*, 2014). O ganciclovir tem sido pesquisado para o tratamento de ceratoconjuntivite causadas por ADVh (HUANG *et al.*, 2014).

Em um relato de caso com dois pacientes transplantados ambos apresentando infiltrado pulmonar foram tratados com cidofovir e imunoglobulina intravenosa e os resultados foram satisfatórios com a remissão dos sintomas (SAQUIB *et al.*, 2010). Mais avanços são necessários para o uso das drogas mais adequadas para o tratamento de infecções por ADVh.

2.8. Pergunta de Partida

Como se caracteriza a distribuição das espécies e tipos dos ADVh associados a casos de IRA em crianças atendidas em um hospital de Fortaleza ao longo 11 anos analisados?

2.9. Hipóteses

- O padrão de circulação das espécies e tipos dos ADVh em Fortaleza durante o período analisado é semelhante aos observados em diversos continentes.
- Os tipos dos ADVh circulantes em Fortaleza entre os anos de estudos foram principalmente os das espécies B e C, sendo estes comumente descritos em estudos no Brasil e na América do Sul.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar os padrões de circulação das diversas espécies e tipos de ADVh em Fortaleza, Ceará – Brasil, durante 11 anos consecutivos (2001-2011) pelo sequenciamento de nucleotídeos das seis primeiras regiões hipervariáveis do *hexon* dos ADVh.

3.2. Objetivos Específicos

1. Comparar o perfil clínico-epidemiológico das IRA causadas por ADVh em crianças atendidas em um hospital de Fortaleza nos anos de 2001 a 2013.
2. Determinar as espécies e tipos de ADVh detectados na população de estudo.
3. Analisar a distribuição sazonal dos adenovírus detectados entre janeiro de 2001 a julho de 2013.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Descrição do Estudo

4.1.1. Tipo de estudo

Esse estudo foi do tipo analítico, transversal, observacional, com amostras coletadas retrospectivamente (janeiro de 2001 a julho de 2012) e de forma prospectiva (agosto de 2012 a junho de 2013) que compreendeu um período total de 150 meses.

4.1.2. População e Local do Estudo

A população de estudo era composta de crianças e adolescentes atendidos na emergência e enfermarias do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) com sinais e sintomas de IRA tanto do trato superior (tosse, coriza, dor de garganta, dor de ouvido) como inferior (dispneia e febre), com os mesmos iniciados há no máximo sete dias, participavam do estudo apenas os pacientes que os pais ou responsáveis concordassem com sua inclusão. O diagnóstico clínico era dado pelo médico que prestava atendimento a cada criança.

O HIAS é um hospital pediátrico de referência que atende mais de 150 mil crianças por ano, sendo o principal hospital pediátrico do Ceará. Está situado em Fortaleza, capital do estado, cidade localizada a 4° ao sul do Equador. Possui 2,5 milhões de habitantes e duas estações distintas: uma chuvosa ocorrendo no primeiro semestre e outra seca nos demais meses do ano. A umidade relativa do ar é alta (>70%) e temperatura pouco variável (26-28° C) durante todo o ano.

4.1.3. Aspectos Éticos

Os procedimentos e protocolos aplicados neste estudo foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HIAS sob o N° 04/06 de 14 de fevereiro de 2006 (Anexo I). Antes da coleta do material clínico os pais ou responsáveis eram informados sobre os objetivos da pesquisa e autorizava a coleta assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

4.1.4. Coleta de Dados e de Material Clínico

As coletas de dados e amostras, aspirados de nasofaríngeo (ANF), eram feitas pelos participantes do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). As coletas ocorriam de forma regular de segunda a sexta. Os responsáveis pelas crianças eram entrevistados para preenchimento da ficha epidemiológica (Anexo III) e os dados clínicos eram obtidos diretamente do médico ou do prontuário em caso de paciente hospitalizado. Os dados pesquisados incluíam: Idade, sexo, data da coleta, sintomas e sinais da infecção e diagnóstico. Todas estas informações eram organizadas em planilhas no Excel compondo o banco de dados de nosso laboratório.

4.2. Diagnóstico Laboratorial

4.2.1. Coleta e Processamento das Amostras

As amostras eram colhidas através do ANF e após devidamente identificadas eram armazenadas em uma caixa térmica contendo bobinas de gelo sob a temperatura de 4° C por no máximo de quadro horas. Posteriormente, eram levadas ao Laboratório de Virologia onde eram imediatamente processadas.

O material era transferido para um tubo *Falcon* contendo 2ml de Meio Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle (MEM-E) adicionado de penicilina 100U e 50mg de gentamicina, L-glutamina a 2%. Uma alíquota de aproximadamente 1ml da amostra já diluída no MEM-E era armazenado a -80° C para posterior estudo e outra parte era utilizada para confecção das lamínas que seriam posteriormente submetidas a Imunofluorescência.

4.2.2. Imunofluorescência

As amostras eram inicialmente triadas para identificação dos vírus Influenza A e B, vírus sincicial respiratório (VSR), ADVh e parainfluenza 1, 2 e 3 pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizando-se do Kit Respiratory Viral Panel I Screening and Identification Kit (Chemicon Light Diagnostics, Temecula, CA, USA). A triagem para metapneumovírus se deu de forma retrospectiva para três anos (2006-2008) se utilizando da imunofluorescência direta (IFD) (Human metapneumovirus [hMPV] Direct Immunofluorescence Assay reagent, Light Diagnostics TM, Chemicon

International Inc., Temecula, CA) ambas as metodologias ocorreram conforme protocolo do fabricante modificado por Moura *et al.* 2006.

4.3. Tipagem Molecular dos ADVh

Amostras de secreção de nasofaringe positivas para ADVh pela IFI, coletadas nos anos de 2001 a 2011 foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus da Universidade de São Paulo (USP) para caracterização de espécie e tipos por métodos de Biologia Molecular.

4.3.1. Extração do DNA Viral

A extração do material genético ocorreu seguindo o protocolo desenvolvido por Shinagawa *et al.* (1983) que consiste na extração seletiva de genomas virais que possuam proteínas ligadas de forma covalente ao seu ácido nucleico. As amostras eram suspensas em tampão de lise, sendo digerida com proteinase K (Invitrogen™, Califórnia, USA) antes da extração fenólica. Os controles adotadas foram água ultra-pura (Milli-Q® Millipore™, Massachusetts, USA) como controle negativo e como positivo, as cepas de ADVh padrão ADVh-3p e ADVh-5p.

As amostras conservadas em Trizol® (Invitrogen™) eram adicionadas 100µl de clorofórmio mais álcool isoamílico (proporção de 1:24). Posteriormente, foram centrifugadas a 12.000 rotações por 15 minutos, houve a formação de duas fases, mas apenas a fenólica contendo o DNA foi utilizada. Em sequência, foram adicionados 750µl de Etanol 100% (Merk S.A. São Paulo, Brasil) e ficavam a -20° C por uma hora, depois eram centrifugado novamente como citado acima. O etanol era descartado e o DNA ressuspenso em 500µl TE 1X (10mM de Tris e 1mM de EDTA). Depois, 10µl de cloreto de sódio (NaCl) 5M e 25µl de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10% foram adicionados e 5µl de proteinase K 10mg/mL (Invitrogen™). As amostras foram incubadas novamente a 60° C por uma hora em banho seco e posteriormente foi extraído com igual volume de fenol/clorofórmio (Invitrogen™; Merck S.A.). As impurezas eram retiradas com éter saturado (Merck S.A.). A precipitação ocorreu com a adição de 500µl de isopropanol (Merck S.A.). As amostras eram incubadas a -20° C por 12 horas e depois centrifugadas a 13000 rotações por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso em 100µl de TE 1X.

4.3.2. PCR e Nested-PCR para Amplificação da Região do Hexon

A caracterização das espécies e tipos foi realizada através do protocolo de Lu e Erdman, 2006, que consiste na PCR com *primers* direcionados para as regiões hipervariáveis do gene *hexon* (HVR1 a HVR6) dos ADVh e seguida de uma *Nested-PCR*. A proteína *hexon* é reconhecidamente alvo de anticorpos neutralizantes utilizados para caracterizar os diversos sorotipos de ADVh. Por isso que o sequenciamento deste gene permite a diferenciação entre as diversas espécies e sorotipos. A tabela 1 apresenta todos os *primers* utilizados nesta etapa.

TABELA 1 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* direcionados à região do Hexon do genoma adenoviral, utilizados para identificação das espécies e sorotipos dos adenovírus detectados.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Referência
AdhexF1	TICTTTGACATTCGIGGIGTICTIGA	764 - 896	Crawford-Miksza; Schnurr, 1996
AdhexR1	CGTTCICIGCCTGRTTCCACA	764 - 896	Crawford-Miksza; Schnurr, 1996
AdhexF2	GGYCCYAGYTTYAARCCCTAYTC	688 - 821	Lu; Erdman, 2006
AdhexR2	GGTTCTGTCICCCAGAGARTCIAGCA	688 - 821	Lu; Erdman, 2006

O primeiro PCR utilizou o par de *primers* AdhexF1 e AdhexR1, na *Nested-PCR* o par de *primers* foi AdhexF2 e AdhexR2. O PCR ocorreu com 45µl mix composto de PCR *Buffer* 1X (Invitrogen™, USA Biotools®), 200µM de DNTPs (Fermentas©), 0,2µM de cada *primer*, 1U da DNA polimerase *Taq* (Invitrogen™, USA Biotools) e água DNase *free* com a adição de 5µl do DNA viral purificado, com um volume final de 50µL. O PCR ocorreu seguindo o seguinte programa: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C a 1 minuto, 45°C a 1 minuto, e 72°C por 1 minuto, e no final 72°C por 5 minutos para a extensão final. Na reação de *Nested-PCR* as concentrações eram as mesma da primeira PCR, mas o volume do mix era de 49µL e apenas 1µL do produto do PCR era adicionado, sendo os tempo e os ciclos semelhante entre as duas reações, modificando-se apenas a temperatura de anelamento dos *primers* que sobe de 45°C para

50°C. Todas as amplificações utilizaram o termociclador Mastercycler egradient S (Eppendorf©).

4.3.3. Sequenciamento do Gene Hexon

O produto do *Nested-PCR* foi sequenciado para determinar as espécies e tipos de ADVh detectados. Para isso, o produto era primeiramente purificado utilizando o ExoSAP-IT® (USB Corporation) conforme instruções do fabricante.

Os *primers* utilizados nas reações de sequenciamento foram os mesmos da reação de *Nested-PCR*. Todas as reações foram feitas em duplicatas tanto com *primers sense* (AdhexF2) como *antisense* (AdhexR2), sendo utilizado para o sequenciamento o BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems©) conforme instruções do fabricante. A reação de amplificação foi no termociclador Mastercycler egradient S (Eppendorf©) e a ciclagem adotada foi 96° C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos.

Na purificação do produto da reação de sequenciamento foi utilizado o CENTRI SEP 96 (Princeton Separations, New Jersey, USA), que consiste na separação em gel do excesso de reagentes da reação de sequenciamento após centrifugação (3000 rotações por 3 minutos). O sequenciador utilizado foi ABI prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems©).

4.3.4. Edição e Análise das Sequências

Para edição das sequências obtidas utilizou-se o *Sequencher* (Gene Codes Corporation). Depois de editadas, foram alinhadas com auxílio do NCBI Blast e comparadas com aquelas já disponíveis em seu banco de dados *on-line* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi? PAGE=Nucleotides](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides)). Assim foi possível determinar as espécies e os tipos de cada ADVh detectado.

4. 4. Análise Estatística

Foi utilizado nesta análise o teste de Fisher, Correlação de *Spearman* e *Odds ratio* (OR), sendo executados no *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS). Os *p*-valor < 0,05 foram considerados com estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da População de Estudo

Entre janeiro de 2001 e junho de 2013, 8.517 amostras foram coletadas e submetidas à IFI. Pelo menos um vírus foi detectado em 2467 (29,97%) destas amostras. Os ADVh foram encontrados em 290 amostras representando 3,41% do total de IRA e 11,76% das IRA virais. O ADVh foi o quarto vírus mais frequente, sendo o mais encontrado o VSR com 1185 cepas representando 48% de todas as amostras positivas para algum vírus. A população de estudo foi dividida em ADVh positiva e ADVh negativos, sendo suas características demonstradas na tabela 2.

TABELA 2: Caracterização da população de estudo comparando crianças ADVh positivas e negativas entre 2001 e 2013 (N= 8.517)

Dados demográficos	ADVh positivas (%)	ADVh negativas (%)	OR (95% CI)	P-Valor
Sexo				
Masculino	166 (57,24)	4696 (57,08)	1,0066 (0,7944-1,2754)	0,9565
Feminino	124 (42,76)	3531 (42,92)		
Idade (Meses)				
0-12	122 (42,07)	3658 (44,46)	0,9070 (0,7155-1,498)	0,4201
13-24	91 (31,38)	2119 (25,75)	1,3181 (1,0236-1,6974)	0,0323
25-36	33 (11,38)	982 (11,94)	0,9485 (0,6562-1,3712)	0,7786
37-48	16 (5,52)	460 (5,59)	0,9856 (0,5902-1,6459)	0,9558
49-60	7 (2,41)	258 (3,14)	0,7640 (0,3573-1,6338)	0,4876
> 60	21 (7,24)	750 (9,12)	0,7783 (0,4961-1,2211)	0,2753
Diagnóstico				
IVAS	155 (53,45)	3870 (47,04)	1,2926 (1,0222-1,6347)	0,0321
Pneumonia	79 (27,24)	1818 (22,10)	1,3199 (1,0139-1,7182)	0,0391
Bronquite	7 (2,41)	345 (4,19)	0,5651 (0,2640-1,2055)	0,1345
Bronquiolite	23 (7,93)	955 (11,61)	0,6559 (0,4262-1,0096)	0,0553
Exacerbação da asma	26 (8,97)	1239 (15,06)	0,5555 (0,3696-0,8348)	0,0047
Setor de atendimento				
Emergência	233 (80,33)	6865 (83,44)	1,2331 (0,9177-1,6568)	0,1645
Enfermarias	57 (19,66)	1164 (16,56)		

ADVh: Adenovírus humano; OR: Odds ratio; CI: Intervalo de confiança

As características de cada grupo foram comparadas entre si através da ferramenta estatística *Odds ratio*, que serve para determinar se algum dado analisado tinha maior ou menor chance de ocorrer na presença do ADVh.

O primeiro dado analisado foi o sexo, a proporção entre crianças do sexo masculino e feminino nos ADVh positivos foi 1.3:1 sendo esta semelhante àquela encontrada nos ADVh negativos. O próximo aspecto analisado era a idade, sendo que a maioria (73,4%) das IRA por ADVh eram encontradas em crianças menores de 2 anos e a idade média dada em meses destes pacientes foi de $24,52 \pm 3,29$ [Intervalo de confiança (CI) de 95%; variação: 1-179 meses]. Quando comparadas as faixa etárias entre os dois grupos, observou-se que entre os 13-24 meses, os pacientes ADVh positivos tinha aproximadamente 32% a mais de chance de está nesta faixa etária do que outro grupo.

As IVAS e pneumonias foram as síndromes clínicas mais frequentemente associadas aos ADVh, representando 53,45% e 27,24% de todos os casos analisados, respectivamente. Em ambos os casos houve uma forte associação estatística entre estas síndromes clínicas e a presença do ADVh, quando comparado com o grupo negativo. Ao contrário, a detecção de ADVh em casos de exacerbação da asma foi menor do que a de outros vírus. Os pacientes com IRA positiva para ADVh tinham quase metade da chance de apresentar este quadro do que aqueles causados por outros agentes (O.R: 0,555; p -valor < 0,01). Os ADVh foram encontrados em 57 (19,66%) pacientes hospitalizados, sendo bronquiolite (37%) e pneumonia (30,43%) os diagnósticos mais frequentes nesses casos, contudo IVAS hospitalares foram observadas em 26% desses pacientes.

Durante o período avaliado foram encontrados 122 casos de coinfeções entre os diversos vírus estudados, os ADVh estavam presente em 60 (49,18%) destas, estas cepas representaram 20,69% de todos os ADVh encontrado com um, dois ou três vírus, aplicado-se *Odds ratio* e comparado com outros agentes foi observado que este vírus tinha cinco vezes mais chance de aparecer em coinfeção do que qualquer outro vírus pesquisado (O.R: 0,555; p -valor < 0,0001). O vírus mais frequentemente detectado nesses casos foi o VSR com 24 casos (40,0%), seguido do influenza com 17 casos (28,33%). Em quatro amostras (6,67%) ocorreu a detecção destes três vírus.

Os pacientes em que o ADVh estava presente em coinfeção com outros vírus apresentavam aproximadamente quatro vezes mais chances de estarem hospitalizados dos que apresentavam uma infecção simples (O.R: 3,9231; p -valor < 0,0001), as coinfeções representaram 33,33% de todos os pacientes internados com este vírus. As coinfeções dos ADVh são descritas na tabela 3.

TABELA 3 – Coinfecções dos ADVh entre 2001 e 2013

Coinfecções	Quantidade (%)
ADVh + VSR	24 (40)
ADVh+ FLU A e B	17 (28,33)
ADVh + PF1, 2 e 3	13 (21,67)
ADVh + MPV	2 (3,33)
ADVh + VSR + FLU A e B	4 (6,67)
Total	60 (100)

ADVh: Adenovírus humano; VSR: Vírus sincicial respiratório; FLU A e B: Influenza A/B; PF1, 2 e 3: Parainfluenza 1, 2 e 3; MPV: Metapneumovírus.

A taxa de coinfecções dos ADVh se apresentou de forma irregular durante o período de estudo, como observado em 2005 e 2010 períodos em que não houve casos de coinfecção e em 2013, ano que encontramos a taxa mais elevada com 80,64% dos ADVh sendo encontrados na presença de pelo menos um outro vírus. A distribuição das amostras coletadas e analisadas em negativas, positivas, positivas para ADVh e coinfecções de ADVh por ano de estudo está representada na tabela 4.

TABELA 4 - Caracterização e distribuição das amostras analisadas por ano de estudo (2001-2013)

Ano	Amostras coletadas	Amostras Negativas (%)	Amostras Positivas* (%)	Total de ADVh Positivas (%)	Coinfecção ADVh e outros vírus (%)
2001	556	316 (56,83)	240 (43,17)	39 (16,25)	7 (17,95)
2002	463	301 (65)	162 (35)	17 (10,49)	4 (23,53)
2003	537	393 (73,18)	144 (26,82)	26 (18,06)	6 (23,10)
2004	411	250 (60,83)	161(39,17)	9 (5,60)	3 (33,33)
2005	490	313 (63,88)	177 (36,12)	14 (7,91)	0 (0)
2006	653	486 (74,43)	167 (25,57)	13 (7,78)	1 (7,69)
2007	624	386 (61,86)	238 (38,14)	40 (16,81)	2 (5)
2008	706	518 (73,37)	188 (26,63)	18 (9,57)	3(16,67)
2009	679	394 (58,03)	285 (41,97)	19 (6,67)	2(10,53)
2010	1119	1006 (89,90)	113 (10,10)	13 (11,50)	0 (0)
2011	1030	747 (72,52)	283 (27,48)	48 (16,96)	6 (12,50)
2012	799	713 (89,24)	86 (10,76)	3 (3,49)	1(33,33)
2013	450	227 (50,44)	223 (49,56)	31 (10,01)	25 (80,64)
Total	8517	6050 (71,03)	2467 (28,97)	290 (11,76)	60 (20,69)

(*) Adenovírus, VSR, Influenza A/B, Parainfluenza 1, 2, 3, Metapneumovírus.

5.2. Distribuição das IRA no Período de Estudo

As IRA ocorreram continuamente ao longo dos quase 13 anos de estudos, sendo anualmente observado dois picos de IRA de intensidades diferentes, um maior no primeiro semestre que apresentava uma correlação positiva com a ocorrência de chuva (Correlação de Spearman: 0,376; p -valor < 0,05) e um pico menor ocorrendo no segundo semestre. Os casos de IRA por ADVh não mostraram relação com o período chuvoso e também não tiveram associação com período seco, sendo indiferente a este fator climático (Correlação de Spearman: 0,063; p -valor > 0,05). A distribuição mensal acumulada no período de estudo da pluviometria, das IRA totais e por ADVh conforme o resultado da IFI é apresentada na figura 5.

Os ADVh apresentaram um padrão irregular de circulação, não sendo possível determinar padrão de sazonalidade. Observou-se que os ADVh estiveram presente em todos os anos analisados, sendo seu número variável a cada ano, com no mínimo três em 2012 e no máximo de 48 em 2013.

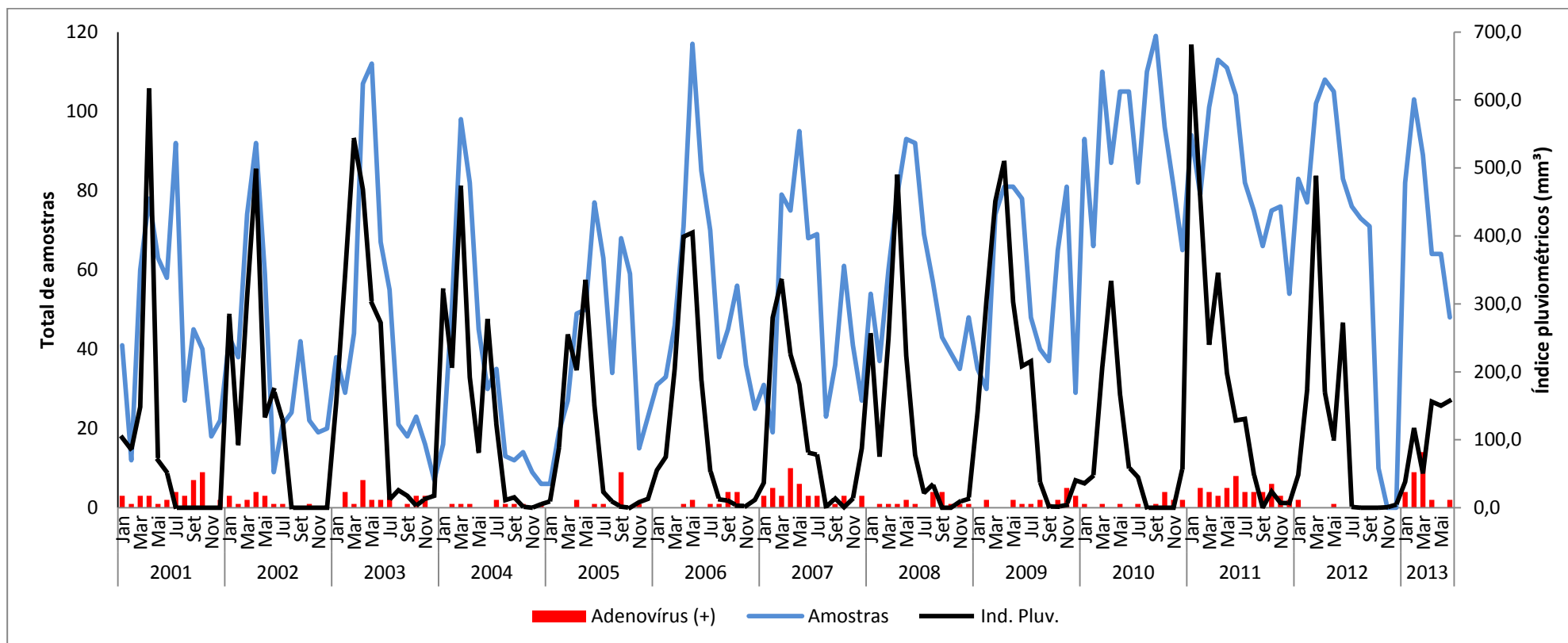


Figura 5 - Distribuição mensal das infecções respiratórias agudas, detecção de ADVh e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001-2013)

Apesar de não ocorrerem em períodos epidêmicos regulares em Fortaleza, quando analisamos a quantidade acumulada de casos por mês, foi observado que os ADVh tinham um maior chance de serem detectados nos meses de setembro e outubro, quando comparados a outros agentes (OR: 1.8790;95% CI: 1.4177-2.4903; p-valor < 0.0001). A distribuição do ADVh e a comparação com as IRA totais acumuladas de 2001 a 2013 por mês de estudo é observada na Figura 6.

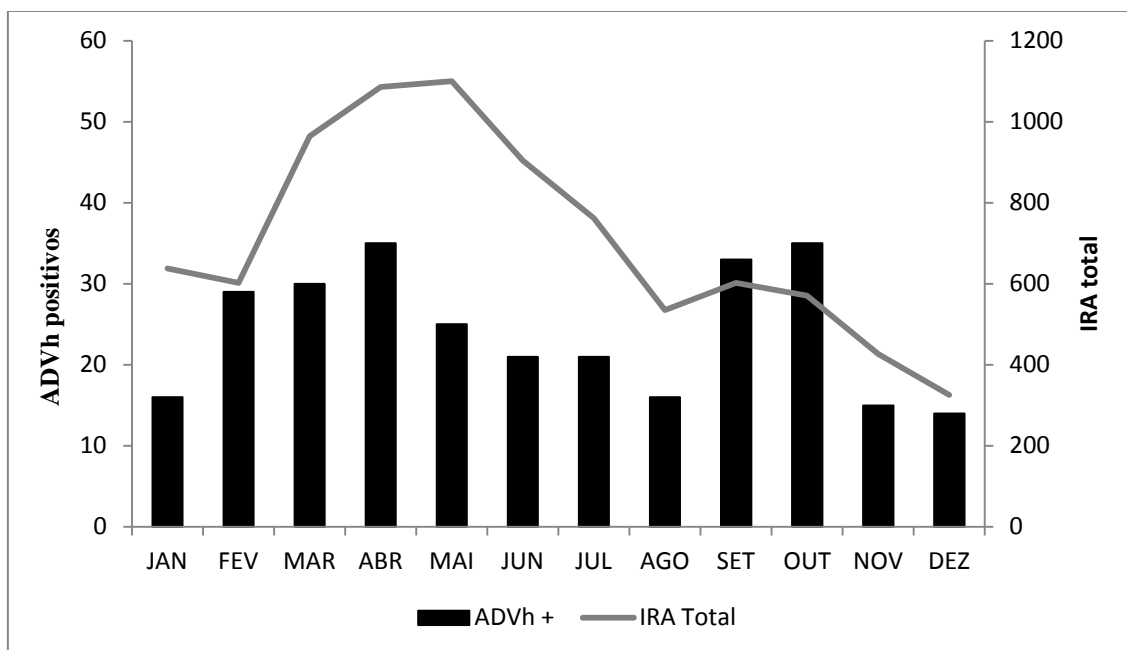


Figura 6 – Distribuição acumulada por mês dos ADVh positivas e das IRA totais entre 2001 e 2013.

5.3. Sequenciamento das Regiões Hipervariáveis do Gene Hexon

Das 290 amostras positivas para ADVh, foram selecionadas 190 entre anos de 2001 a 2011, que representaram 65,52% de todos os ADVh isolados durante o período de estudo, sendo determinada a espécie e o tipo pelo sequenciamento das regiões hipervariáveis. Foi possível determinar a espécie e o tipo de 189 com apenas uma ficando indeterminada. Durante este período foram encontradas três espécies: 162 (85,72%) ADVh-B, 21 (11,11%) ADVh-C e 6 (3,17%) ADVh-E.

A cocirculação das três espécies e o predomínio do ADVh-B sobre os ADVh-C e ADVh-E foram observadas nas amostras dos anos de 2001 a 2011. A caracterização das espécies identificadas entre os anos de 2001 a 2011 e sua distribuição por cada ano de estudo se encontra na tabela 5.

TABELA 5 - Distribuição em espécies dos ADVh detectados entre 2001 a 2011 e analisados por sequenciamento do gene hexon

Ano	Amostras Coletadas	ADVh positiva (%)	ADVh tipados (%)	ADVh-B (%)	ADVh-C (%)	ADVh-E (%)
2001	556	39 (7,01)	23 (58,97)	20 (86,96)	3 (13,04)	0
2002	463	17 (3,67)	14 (82,35)	14 (100)	0	0
2003	537	26 (4,84)	24 (92,31)	22 (95,65)	1 (4,35)	0
2004	411	9 (2,19)	7 (77,78)	7 (100)	0	0
2005	490	14 (2,86)	13 (92,86)	12 (92,31)	1 (7,69)	0
2006	653	13 (2,00)	13 (100)	12 (92,31)	1 (7,69)	0
2007	624	40 (6,41)	38 (95)	33 (86,84)	2 (5,26)	3 (8,90)
2008	706	18 (2,55)	15 (83,33)	12 (80%)	1 (6,67)	2 (13,33)
2009	679	19 (2,80)	17 (89,47)	16 (94,12)	1 (5,88)	0
2010	1119	13 (1,16)	9 (69,23)	6 (66,67)	2 (22,22)	1 (11,11)
2011	1030	48 (4,66)	17 (35,42)	8 (47,06)	9 (52,94)	0
Total	7268	256 (3,52)	190 (65,52)	162 (85,72)	21 (11,11)	6 (3,17)

Durante os anos de 2001 a 2011 foram identificados sete diferentes tipos de ADVh em nossa população. Os tipos predominantes foram o 3 e o 7, presentes em 128 (67,72%) e 34 (18,00%) amostras, respectivamente. A seguir, os tipos 1 e 2 foram identificados em 8 amostras (4,24%) cada. O tipo 4 foi detectado em 6 (3,18%) das amostras analisadas (Tabela 6). Dentre os ADVh tipados, 22 eram de pacientes hospitalizados, sendo os tipo 3 e 7 identificados em 15 (68,18%) e 4 (18,18%) dos casos, respectivamente. Nos outros três casos encontrados em pacientes hospitalizados foram detectados os tipos 1, 2 e 4.

Os diferentes tipos não estão igualmente distribuídos nos anos de estudo. O único tipo circulante em todos os anos foi o 3. O tipo 7 não foi detectado nos anos 2006, 2010 e 2011, enquanto os outros tipos identificados apresentaram uma distribuição bastante irregular. Somente a partir de 2007 foram detectados os tipos 2 e 4 (Tabela 6).

TABELA 6 - Caracterização das espécies e tipos de ADVh circulantes em crianças com IRA atendidas no HIAS em Fortaleza entre 2001 e 2011 (n=7524)

Ano	Total de Amostras	Amostras ADVh + por IFI (%)	Espécies			Espécie/Tipos						
			ADVh-B	ADVh-C	ADVh-E	ADVh-B		ADVh-C				ADVh-E
						3 (%)	7(%)	1(%)	2(%)	5(%)	6(%)	4(%)
2001	556	39 (7,01)	20 (86,96)	3 (13,04)	0	10 (43,48)	10 (43,48)	2 (8,7)	0	1 (4,34)	0	0
2002	463	17 (3,67)	14 (100)	0	0	9 (64,29)	5 (35,71)	0	0	0	0	0
2003	537	26 (4,84)	22 (95,65)	1 (4,35)	0	17 (73,91)	5 (21,74)	1(4,35)	0	0	0	0
2004	411	9 (2,19)	7 (100)	0	0	5 (71,43)	2 (28,57)	0	0	0	0	0
2005	490	14 (2,86)	12 (92,31)	1(7,69)	0	7 (53,85)	5 (38,46)	1 (7,69)	0	0	0	0
2006	653	13 (2,00)	12 (92,31)	1 (7,69)	0	12 (92,31)	0	0	0	1 (7,69)	0	0
2007	624	40 (6,41)	33 (86,84)	2 (5,26)	3 (8,90)	28 (73,69)	5 (13,16)	1 (2,63)	1 (2,63)	0	0	3 (7,89)
2008	706	18 (2,55)	12 (80%)	1 (6,67)	2 (13,33)	11 (73,33)	1 (6,67)	1 (6,67)	0	0	0	2 (13,33)
2009	679	19 (2,80)	16 (94,12)	1 (5,88)	0	15 (88,24)	1 (5,88)	0	1 (5,88)	0	0	0
2010	1119	13 (1,16)	6 (66,67)	2 (22,22)	1 (11,11)	6 (66,67)	0	0	2 (22,22)	0	0	1 (11,11)
2011	1030	48 (4,66)	8 (47,06)	9 (52,94)	0	8 (47,06)	0	2 (11,76)	4 (23,54)	2 (11,76)	1 (5,88)	0
Total	7268	256 (3,52)	162 (85,72)	21 (11,11)	6 (3,17)	128 (67,72)	34 (18)	8 (4,24)	8 (4,24)	4 (2,12)	1 (0,6)	6 (3,18)

6. DISCUSSÃO

Os dados apresentados nesse estudo representam a continuidade de uma série de pesquisas sobre viroses respiratórias em Fortaleza realizadas desde 2001 (ALONSO *et al.*, 2012; FÉ *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2013) onde um trabalho já havia sido construído sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e clínicos das infecções infantis pelos ADVh (MESQUITA, 2007). Assim, nesta seção serão discutido com maior profundidade a taxa de detecção dos ADVh como agente de IRA na população pediátrica, a caracterização do padrão de atividade dos ADVh e a diversidade de espécies e tipos deste vírus circulantes em Fortaleza durante os quase 13 anos de estudo.

Em relação aos estudos brasileiros publicados sobre a epidemiologia dos ADVh, esse estudo pode ser considerado de longa duração e com um número de cepas identificadas elevado (ALBUQUERQUE *et al.* 2003; LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2007a; MOURA *et al.* 2007b). Uma série de estudos foram publicados no Brasil sobre os ADVh e tinha períodos prolongados de estudos (LUIZ *et al.*, 2010; KAJON *et al.*, 1999; MORAES *et al.*, 1997). Contudo, apenas um trabalho realizado em São Paulo, capital, entre os anos 1995 a 2006, conseguiu identificar um número maior de cepas que em nosso trabalho (MARINHEIRO, 2009). No Nordeste brasileiro, pode ser citado apenas um estudo realizado com crianças na cidade de Salvador onde a atividade das diversas espécies e tipos foi observada durante um ano (MOURA *et al.*, 2007a).

A baixa taxa de detecção dos ADVh encontrada neste estudo (3,41%) é similar às descritas em estudos que utilizaram a IFI para detecção deste vírus (BARRERO *et al.* 2012; LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2007a; MOURA *et al.* 2007b). Os ADVh foram apenas o quarto vírus mais detectados entre os pesquisados por imunofluorescência. Estudos que utilizaram as técnicas moleculares como o PCR obtiveram taxas de detecção superiores a aquela observada em nossos dados (BEZERRA *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2013; STROPARO *et al.*, 2010). Em um trabalho conduzido na cidade de Recife, Pernambuco, que utilizou a técnica de *multiplex*-PCR para a identificação de 17 diferentes patógenos em uma população pediátrica com quadro de IRA, observou-se que os ADVh estavam presente em 25% das amostras positivas para algum dos agentes testados, sendo ele o segundo mais encontrado ficando atrás apenas do VSR (BEZERRA *et al.*; 2011).

Os métodos de Biologia Molecular geralmente apresentam sensibilidade bem superior à da IFI em relação aos ADVh, contudo, a IFI continua sendo amplamente utilizada pelos sistemas de vigilância de vários países, inclusive o Brasil, por ser um método de baixo custo e de fácil aplicação (MARCONE *et al.*, 2013; SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012).

As taxas de detecção de ADVh em coinfeções (20,69%) é relatada muito comumente, algumas vezes em taxas superiores a relatada neste estudo (AMPUERO *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.* 2011; KIM *et al.* 2013; PRETORIUS *et al.*, 2012). Contudo, é necessário cuidado na interpretação dos testes de detecção de ADVh, seja como agente único ou em coinfeções, pois há trabalhos que observaram a capacidade de liberação persistente deste vírus enquanto outros relatam a detecção desses vírus em indivíduos assintomáticos, dificultando sua implicação nos quadros respiratórios agudos (BRANDT *et al.*, 1969; KALU *et al.*, 2010; THAVAGNANAM *et al.*, 2010).

Inúmeros fatores podem influenciar na detecção dos ADVh. Entre eles podem ser citados: as síndromes clínicas analisadas, local de atendimento do paciente, o período de estudo e o material clínico e as metodologias empregadas para sua detecção. Analisando-se os vários fatores citados como responsáveis pela variação nas taxas de detecção dos ADVh, podemos comentar alguns aspectos característicos do nosso estudo e como eles podem ter influenciado na taxa encontrada.

O primeiro deles é a idade da população geral do estudo que variou entre 0 e 16 anos, o que representou a faixa etária dos pacientes atendidos no HIAS. As crianças que sofriam de IRA por ADVh era predominantemente meninos no segundo ano de vida, achados semelhantes haviam sido encontrados em outros trabalhos (BICER *et al.*, 2013; TABAIN *et al.*; 2012; YEUNG *et al.*, 2009). As crianças de até dois anos de idade representaram 73,4% dos ADVh detectados, já pacientes com idade superior a cinco anos eram apenas 7,4% destes casos. O pequeno número de casos na faixa etária maiores de cinco anos foi demonstrado em diversos estudos e pode indicar que neste grupo as manifestações clínicas pelos ADVh são mais brandas, sem a necessidade de atendimento médico (COOPER *et al.*, 2000; LAI *et al.*, 2013; MARCONE *et al.*, 2013; TABAIN *et al.*; 2012). É oportuno ressaltar que os ADVh são importantes patógenos respiratórios na população adulta, principalmente entre aqueles que estão em situação de

aglomeração ou fadiga, como por exemplo militares em treinamento e idosos em abrigos (HOKE; SNYDER, 2013; KANDEL *et al.*, 2010).

Um segundo fator a ser analisado é o setor atendimento dos pacientes. A taxa de detecção dos ADVh entre os pacientes hospitalizados foi de aproximadamente 5%, sendo superior a encontrada nos paciente atendidos na emergência (3,4%). A taxa de detecção dos ADVh em pacientes hospitalizados é semelhante às descritas em estudos com pacientes internados e uma taxa de detecção maior já havia sido observada quando comparados os pacientes hospitalizados e os atendidos na emergência (BARRERO *et al.* 2012; LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.* 2007b). Dois estudos promovidos com crianças hospitalizadas com quadro de IRA encontraram elevadas taxas de detecção dos ADVh, o primeiro em Istambul, Turquia, identificou o ADVh em 26,2% de todas as suas amostras (BICER *et al.*, 2013) e em São Paulo sua participação foi em 22% de todas as IRA identificadas (MARINHEIRO, 2009). Apenas 14,67% da população do presente estudo eram pacientes internados. Isso reflete a população de pacientes internados no HIAS que é um hospital de nível terciário e de ensino. Dessa forma a maioria dos pacientes atendidos no setor de emergência por IRA recebe tratamento em casa, um número menor de pacientes, aqueles com IRA mais graves são encaminhados para internação em hospitais de nível secundário ou terciário dependendo da existência de leitos, e uma parcela menor é internada no próprio HIAS.

A taxa de detecção viral depende também do tipo de material clínico analisado e dos métodos utilizados para sua pesquisa. Neste estudo, o ANF foi utilizado como espécime clínico e a técnica de triagem empregada para a detecção do antígeno viral foi a IFI por si tratar de uma técnica de diagnóstico rápido e de baixo custo. Esta técnica exige uma amostra em células integras e, diferente do isolamento viral em cultura de células, não depende da capacidade infectante do vírus presente na amostra. Além disso, os mais de 13 anos de utilização dessa técnica em nosso laboratório garantem a experiência necessária para execução e interpretação dos resultados da mesma. A IFI apresenta sensibilidade e especificidade para os ADVh bem variadas quando comparamos com a cultura celular, padrão-ouro, e metodologias moleculares. Stroparo *et al.* 2010 compararam a IFI com o PCR na detecção dos ADVh em pacientes pediátricos e imunocomprometidos com IRA e a taxa saltou de 2,6% na IFI para 10% com a metodologia molecular.

A introdução das metodologias moleculares nos diagnósticos de rotina tem associado os ADVh a diversas síndromes clínicas e sua taxas de detecção em pacientes pediátricos com IRA têm se mostrado superior a estudos que utilizaram IFI e a cultura celular como método de triagem (STROPARO *et al.*, 2010). Devido aos altos custos para a execução destas técnicas, em nosso trabalho, elas ficaram restritas a determinação das espécies e dos tipos de ADVh. No passado, a caracterização sorotípica dos adenovírus se dava a partir de isolados virais em culturas submetidos a testes de neutralização com soros policlonais sorotipo-específico. Contudo, esses métodos são demorados e propensos a reações cruzadas entre alguns sorotipos e linhagens intermediárias (SERANTIS *et al.*, 2004; WADELL *et al.*, 1980). Atualmente, as técnicas de biologia molecular são os métodos mais rápidos e confiáveis para a determinação das espécies e tipos de ADVh, permitem uma análise epidemiológica a nível molecular e possibilita a detecção de coinfeções por diferentes ADVh que podem servir como fonte para o surgimento de novas cepas (MCCARTHY *et al.* 2009; VORA *et al.*, 2006). Estes novos métodos se baseiam na amplificação e sequenciamento das regiões hipervariáveis do gene *hexon* (HVR1 a HVR6) permitindo a identificação dos 54 sorotipos descritos até o momento (LU; ERDMAN, 2006).

Neste estudo foram incluídos pacientes que apresentavam tanto quadro infecções respiratórias altas quanto baixas, porém as maiores taxas de detecção dos ADVh foram observados em pacientes com infecção respiratória alta, mas entre as infecções baixas a mais frequente foi a pneumonia, sendo este fato observado em diversos estudos (JIN *et al.* 2013; LUIZ *et al.*, 2010; MARCONE *et al.*, 2013; MESQUITA, 2007). Contudo, o percentual de detecção dos ADVh entre os casos de IRA baixas encontrado neste estudo não deve ser subestimado. Estudos que analisaram a participação deste vírus como agente etiologia das bronquiolites e pneumonias, destacam o papel dos ADVh nestas infecções (JIN *et al.* 2013; KHAMIS *et al.*, 2012; TEBRUEGGE; CURTIS, 2012). Os quadros clínicos causados por este vírus podem variar na sua forma de apresentação, sendo desde um resfriado até a uma pneumonia fatal (TANG *et al.*, 2013). As causas destas variações ainda não estão bem esclarecidas. Contudo, parece que as epidemias de infecções respiratórias graves por ADVh estão associadas a determinados sorotipos emergentes, como os ADVh-3 e 7, na Coreia e Taiwan, e ADVh-14 nos Estados Unidos (CDC, 2007; KIM *et al.* 2003; LAI *et al.* 2013).

Entre os pacientes hospitalizados as síndromes clínicas mais comuns foram a pneumonia e a bronquiolite, duas síndromes clínicas comumente encontradas entre pacientes internados com quadro respiratório por ADVh (JIN *et al.* 2013; ROJAS *et al.*, 2012). As pneumonias associadas à ADVh nesse estudo foram observadas principalmente entre os pacientes que recebiam atendimento na emergência mais que não necessitaram de hospitalização, retornando para tratamento em casa. Devido ao não acompanhamento desses pacientes não se pode avaliar a evolução das pneumonias nestes casos. Já naqueles que foram internados por pneumonia no HIAS nenhum evoluiu para o óbito.

Outro dado interessante observado entre os pacientes hospitalizados é o número de IVAS hospitalares que representou 26% das IRA em pacientes internados. Diversos estudos já haviam observado a capacidade dos ADVh de circular entre pacientes hospitalizados, principalmente em países em desenvolvimento onde as enfermarias possui diversos leitos próximos e o isolamento de pacientes é difícil de se realizar. Crianças com alguma doença de base, que passam por períodos prolongados de hospitalização, tem um alto risco de desenvolverem infecções graves pelos ADVh e se tornam possíveis fontes para transmissão nosocomial deste agente, sendo necessário uma vigilância constante dentro deste grupo de paciente (HATHERILL *et al.*, 2004; LARRAÑAGA *et al.*, 2007; PALOMINO *et al.*, 2000).

Quando a caracterização dos índices de circulação dos ADVh em Fortaleza, este estudo apresenta dados que confirmam o que já havia sido descrito em um estudo que analisou a atividade dos ADVh de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 (MESQUITA, 2007). A irregularidade da ocorrência anual de casos e a ausência de associação das IRA por ADVh com a estação chuvosa são observações semelhantes nos dois estudos. A principal alteração climática de Fortaleza é a chuva, que ocorre sempre no primeiro semestre do ano, geralmente de março a junho, período denominado de “quadra chuvosa”. Estudos prévios na nossa cidade já demonstraram associação entre o maior pico de IRA e a estação chuvosa a vírus como VSR e o influenza, mas o mesmo não ocorreu com o ADVh (ALONSO *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2013). Por sua vez, a correlação entre a ocorrência da estação seca ao vírus parainfluenza 3, já relatada, também não é observada com o ADVh, apesar das maiores chances de se detectar este vírus ocorram nos meses secos de setembro e outubro (FÉ *et al.*, 2008). Portanto, a distribuição das IRA associadas aos ADVh em Fortaleza ocorre ao longo do ano, como

relatado em vários estudos seja em regiões equatoriais como a nossa, seja em regiões temperadas (ALHARBI *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*; 2011).

Além da chuva alguns outros fatores climáticos como a temperatura, umidade relativa do ar, radiação ultravioleta (UVB) e velocidade dos ventos mostram relação com período epidêmico de alguns vírus, como, por exemplo, o VSR (NOYOLA; MANDEVILLE, 2008; WELLIVER, 2009). A hipótese é que a radiação UVB pode inibir a disseminação entre os hospedeiros de vírus com VSR e MPV pela inativação dos mesmos no ambiente. A UVB pode agir também de forma indireta na atividade de diversos vírus pela estimulação da produção de vitamina D nos hospedeiros (YUSUF *et al.*, 2007). A vitamina D, por sua vez, pode ser capaz de aumentar a expressão de algumas proteínas antivirais como as catelicidinas e as defensinas que protege os hospedeiros de vírus invasores (DAHER *et al.*, 1986). Em estudo realizado com crianças hospitalizadas por bronquiolite, avaliou-se a ação destas variáveis climáticas sobre as taxas de detecção dos ADVh ao longo de dois anos de estudo (2009-2010), não sendo possível correlacionar nenhum destes fatores ao aumento ou diminuição da circulação dos ADVh na população analisada (CHEN *et al.*, 2013).

As infecções por ADVh podem ocorrer de forma endêmica durante todo o ano ou epidêmica dependendo do tipo envolvido e do clima (FADEN *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2014). Um maior número de casos de IRA por ADVh foi observado em períodos de temperaturas mais baixas, inverno e outono. Nesta época as infecções respiratórias virais são mais prevalentes (ALHARBI *et al.*, 2012; LUIZ *et al.*, 2010; MARINHEIRO, 2009). Na China, durante seis anos (2006-2012), em um estudos conduzido entre pacientes hospitalizados com bronquiolite, os ADVh circularam principalmente nos meses de primavera e verão (SUN *et al.*, 2014). Está bem demonstrado a tendência epidemiológica dos ADVh de causar surtos de conjuntivite e faringoconjuntivites durante a primavera, provavelmente por reativação dos ADVh a partir de reservatórios amigdalianos e posterior transmissão a hospedeiros susceptíveis (REINA *et al.*, 2004).

No que se refere ao Brasil, apesar de os ADVh serem encontrados em todos os períodos do ano, em São Paulo e Minas Gerais, na região Sudeste, o aumento no número de casos dos ADVh em casos respiratórios é observado nas estações de outono e primavera (LUIZ *et al.*, 2010; MARINHEIRO, 2009).

A análise dos quase 13 anos de estudo mostrou a variabilidade do número de casos dos ADVh positivos, não sendo possível determinar um comportamento sazonal do mesmo durante o período analisado, não havendo um período epidêmico bem definido para os ADVh em Fortaleza. Como visto neste estudo, o número de infecções por ADVh em cada ano variou entre o mínimo de três em 2012 e no máximo de 48 em 2011, resultando em uma taxa de detecção que variou entre 3,49% e 18,06% de todas as amostras positivas para algum vírus a cada ano. Em estudos promovidos na Argentina e no Brasil, o primeiro entre os anos de 1999 e 2010, encontrou taxas de detecção dos ADVh variando entre 1.05% e 10.8%, já o segundo ocorreu entre os anos de 1995 e 2006 e verificou taxas que variaram mais do que neste estudo com a maior ocorrendo em 2001 com 44% e a menor em 2006 com 15%. É oportuno ressaltar que tanto o trabalho argentino quanto o brasileiro incluíram apenas pacientes hospitalizados. Contudo, o trabalho promovido na cidade São Paulo utilizou o PCR com metodologia de triagem, o que pode explicar as taxas de detecção mais elevadas do que o trabalho argentino e do nosso estudo, que utilizaram a IFI como método de triagem, sendo esta consagradamente menos sensível que a primeira para a detecção dos ADVh (BARRERO et al. 2012; MARINHEIRO, 2009).

Estudos sobre a caracterização das espécies e dos tipos dos ADVh circulantes em uma determinada região fornecem importantes informações para o entendimento da epidemiologia e a patogênese dos ADVh, uma vez que essas variabilidades têm sido implicadas como fatores que influenciam na gravidade, na ocorrência de reinfecções e no padrão de circulação anual dos ADVh (COOPER *et al.*, 2000; LEBECK *et al.*, 2009; MCCARTHY *et al.*, 2009). Há muito ainda para se entender sobre a epidemiologia e a presença das diversas espécies e tipos de ADVh no Brasil, este é o segundo estudo conduzido na região Nordeste do país. Porém, é o primeiro a englobar um período tão longo e com um número elevado de amostras (MOURA et al., 2007a).

A tipagem dos ADVh ocorre tradicionalmente por duas técnicas: a reação de neutralização e a técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A tipagem dos ADVh por métodos clássicos, como o teste de neutralização, requer reagentes policlonais hiperimunes de difícil aquisição, os resultados podem demorar semanas para serem confirmados. A interpretação destes resultados exige cuidado devido à elevada taxa de casos falsos-positivos, pela grande possibilidade de reação cruzada entre os tipos. A

técnica de RFLP é uma alternativa aos testes de neutralização, oferece a possibilidade de além das espécies e tipos, as variações no genoma dos vírus que permite determinar os genótipos. Contudo, este método requer sucessivas passagens do vírus em cultura celulares, o que torna impraticável em estudos com número elevado de amostras (LU; ERDMAN, 2006).

Devemos ressaltar que nem todos os ADVh detectados neste estudo foram submetidos à caracterização das espécies e dos tipos. Aproximadamente 65% de todos os ADVh tiveram a sua espécie e tipo identificada. A não inclusão de todas as cepas identificadas ocorreu devido ao extravio de algumas amostras mais antigas durante o armazenamento, mas principalmente por não ter sido incluída nesta etapa as amostras dos anos de 2012 e 2013, devido a dificuldades no processo de transporte das mesmas. Sendo assim, apenas amostras entre os anos de 2001 a 2011 tiveram sua espécie e tipo determinada.

Para realização da análise da diversidade dos tipos e espécies dos ADVh circulantes em Fortaleza de 2001 a 2011, optou-se por amplificar e sequenciar as seis primeiras regiões hipervariáveis dos gene hexon, o que permite determinar os 54 tipos conhecidos até o momento, sendo uma alternativa mais rápida e confiável que os métodos tradicionais tipagem dos ADVh (LU; ERDMAN, 2006).

Vários cuidados foram tomados para a validação desse trabalho assim com para descartar a hipótese de contaminação das amostras analisadas. A reação de *nested* PCR aumenta a sensibilidade do PCR e também a chance de contaminação durante o seu processo de realização (LU; ERDMAN, 2006; MARINHEIRO, 2009). A contaminação intralaboratorial foi descartada pelo fato de haver uma barreira física entre as salas do pré e pós-amplificado, ou seja, as salas eram separadas e distintas. Alguns cuidados foram adotados durante os procedimentos, como o uso de aventais e propés descartáveis próprios em cada sala. A reação de *nested* PCR era realizada na sala do pós-amplificado dentro da capela de fluxo laminar.

A análise das espécies e tipos de ADVh presentes em Fortaleza entre 2001 e 2011, demonstrou que havia três espécies circulantes na população de estudo, os ADVh-B, C e E, sendo observado o predomínio da espécie B em todos os anos analisados, exceto em 2011, quando a espécie C foi predominante. O predomínio da espécie B sobre a C, já havia sido demonstrada em diversos estudos (BARRERO *et al.*,

2012; LEE *et al.*, 2010; MARINHEIRO, 2009; MOURA *et al.*, 2007b; ROJAS *et al.*, 2012). Neste aspecto, os resultados deste estudo diferem daqueles relatados em estudo prévio realizado na cidade de Salvador, onde foi demonstrado no período de uma ano, de janeiro a dezembro de 1998, o predomínio significativos da espécie C sobre os ADVh-B (MOURA *et al.*; 2007a).

A alternância do predomínio entre as espécies B e C têm sido relatada. Durante o período de domínio de alguma das espécies podem ser seguido pelo predomínio da outra. Em São Paulo, analisando-se 11 anos consecutivos de circulação dos ADVh (1995-2006), evidenciou-se a cocirculação das duas espécies com o predomínio dos ADVh-B na maioria dos anos. No entanto, o predomínio dos ADVh-C foi observado em 1995 e 1997 (MARINHEIRO, 2009). A prevalência dos ADVh-C sobre os ADVh-B também já foi relatada em estudos que envolveram diversos países da America Latina (AMPUERO *et al.*, 2012; GARCÍA *et al.*, 2009).

Estudos realizados na cidade São Paulo mostraram a circulação dos ADVh, com predomínio dos ADV-B sobre os ADVh-C na maioria dos anos analisados (MARINHEIRO, 2009; MOURA *et al.*, 2007b). Entretanto, nas cidades de Belém, na região Norte do Brasil, e Uberlândia e Salvador, região Sudeste e Nordeste respectivamente, o ADVh-C foi a espécie predominante em todos os períodos analisados (LUIZ *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2007a; KAJON *et al.*, 1999).

Os estudos sobre a variabilidade das espécies dos ADVh foram complementados por estudos sobre a sua variabilidade de espécies. Durante cada ano estudado, verificou-se a circulação de sete diferentes tipos de ADVh, com o predomínio do tipo 3 em todos os anos analisados. O predomínio da espécie ADVh-B, tipo 3, visto neste estudo é semelhante ao relatado em estudos recentes produzidos na Colômbia e na Coréia do Sul (LEE *et al.*, 2010; ROJAS *et al.*, 2012). O predomínio de ADV-B também é relatado na Argentina em estudo que analisa a circulação de ADVh de 1999 a 2010, embora o tipo predominante nesse país seja o 7 (BARRERO *et al.*, 2012). No sudeste brasileiro, há relatos da circulação predominante de ADVh-C (LUIZ *et al.*, 2010) e de ADVh-B, sendo o ADVh-7 o tipo predominante (MOURA *et al.*, 2007b). No que se refere à atividade dos ADVh-C em Fortaleza, observou-se que os tipos circulantes eram no máximo de dois, sendo que na maioria dos anos apenas um tipo foi detectado, isso difere consideravelmente do apresentado em estudo realizado na cidade de Salvador,

onde observou-se uma maior diversidade de ADVh-C em apenas um ano (MOURA *et al.*, 2007a). Em Fortaleza, somente em 2011, observou-se a circulação de quatro tipos diferentes de ADVh-C.

O ADVh-4, único representante da espécie E, tem sido frequentemente associado a IRA em recrutas norte-americanos (KOLAVIC-GRAY *et al.*, 2002). No entanto este tipo tem sido detectado na população pediátrica em taxas relativamente inferiores a de outros sorotipos, como ocorreu neste e em outros estudos (ZOU *et al.*, 2012). Entre os ADVh circulantes em Fortaleza esse tipo foi detectado em amostras coletadas a partir de 2007, de crianças com IVAS (2 casos), pneumonia (3 casos) e em um caso de exacerbação de asma. Contudo, o relato de sua detecção no Brasil já havia ocorrido em secreção nasofaríngea coletada de uma criança com IRA em uma cidade do estado de Minas Gerais (sudeste do Brasil) no ano de 2002 (autor, comunicação pessoal) (LUIZ *et al.*, 2010).

Os fatores que influenciam a dinâmica de circulação das espécies e dos tipos de ADVh ainda não são bem conhecidos. Diversas hipóteses foram construídas para explicar a diferença de predomínio de um tipo em relação a outro em determinada região, a primeira seria a ação de fatores ambientais, como a umidade e a temperatura e a segunda poderia ser a interação favorável ou não com outros vírus respiratórios circulantes. Esta dinâmica também pode ser influenciada pela seleção natural, devido à imunidade adquirida que contribui para o declínio de um tipo, porém a queda no nível de imunidade da população a certos tipos ou a introdução de tipos emergentes, como aconteceu nos EUA com o ADVh-14, podem resultar em um aumento na prevalência de determinados tipos e até na modificação dos padrões de circulação dos ADVh em certas regiões (ABBAS *et al.*, 2013; CDC, 2007).

Na cidade de São Paulo foi bem demonstrado o processo de predomínio de um tipo num determinado período, seguido do domínio de outro tipo. Entre 1995 e 2002, os ADVh-7 era o mais frequente. Contudo, a partir de 2003 o ADVh-3 substituiu o ADVh-7 como tipo dominante até o final do período analisado em 2006, lembrando que os dois tipos cocircularam em todo o período de estudo (MARINHEIRO, 2009). Processo semelhante foi observado em um estudo canadense, onde o ADVh-3 foi substituído pelo ADVh-2 como tipo predominante (ABBAS *et al.*, 2013).

O presente estudo gerou os primeiros dados sobre a epidemiologia molecular dos ADVh circulantes em Fortaleza e permitiu caracterizar de forma mais clara o distribuição deste vírus no decorrer de 13 anos de estudo. Contudo, o melhor conhecimento da circulação de ADVh poderá ser alcançado se a vigilância for contínua e associada ao uso de métodos de maior sensibilidade na detecção desses vírus.

7. CONCLUSÃO

- O ADVh foi o quarto vírus mais frequentemente detectado em IRA na população de estudo o que confirma sua importância entre os principais agentes destas infecções em crianças de Fortaleza;
- Observou-se uma variação no número de IRA causadas pelos ADVh em cada ano de estudo, não havendo associação com a estação chuvosa e sem período epidêmico bem definido;
- As coinfeções com outros vírus respiratórios representaram uma importante parcela das IRA causadas pelos ADVh;
- Durante o período analisado houve a cocirculação das espécies e tipos do ADVh com o predomínio do ADVh-B entre os anos de 2001 a 2010;
- Sete diferentes tipos foram encontrados na população pediátrica de Fortaleza, com predominante do tipo 3 da espécie ADVh-B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.Z.; LOMBOS, E.; DUVVURI, V.R.; *et al.* Temporal changes in respiratory adenovirus serotypes circulating in the greater Toronto area, Ontario, during December 2008 to April 2010. *Virology Journal*, doi: 10.1186/1743-422X-10-15, 2013.

AHMED, J. A.; KATZ, M. A.; AUKO, E.; *et al.* Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007-2010. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, n. 7, p. 1-8, 2012.

ALHARBI, S.; VAN CAESELEE, P.; CONSUNJI-ARANETA R.; *et al.* Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, p. 55, 2012.

ALONSO, W. J.; LARANJEIRA, B. J.; PEREIRA, S. A. R.; *et al.* Comparative dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an equatorial city. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 31, n. 1, p. e9-14, 2012.

AMPUERO, J.S.; OCAÑA, V.; GÓMEZ, J.; *et al.* Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *Plos One*. v. 7, n. 10, e46898, 2012.

ARNBERG, N.; PRING-AKERBLOM, P.; WADELL, G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *Journal of Virology*, v. 76, n. 17, p. 8834-41, 2002.

ARNOLD, J. C.; SINGH, K. K.; SPECTOR, S. A.; *et al.* Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 3, p. 283-8, 2006.

BARRERO, P.R.; VALINOTTO, L.E.; TITTARELLI, E.; *et al.* Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010). *Journal of Clinical Virology*, v. 53, n. 2, p. 145-150, 2012.

BERGELSON, J.M.; CUNNINGHAM, J.A.; DROGUETT, G.; *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, v. 275, n. 5304, p. 1320-3, 1997.

BEZERRA, P.G.; BRITTO, M.C.; CORREIA, J.B.; *et al.* Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *Plos One*, v. 6, n. 4, e18928, 2011.

BICER, S.; GIRAY, T.; ÇÖL, D.; *et al.* Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 39, n. 22, p. 1- 10, 2013

BRANDT, C.D.; KIM, H.W.; VARGOSKO, A.J.; *et al.* Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *American Journal of Epidemiology*, v. 90, n. 6, p. 484-500, 1969.

BRASIL, Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos – 2009. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c07.def> [Acessado em 14.02.14].

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; *et al.* WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, v. 365, n. 9465, p. 1147-52, 2005.

CARR, M. J.; KAJON, A. E.; LU, X.; *et al.* Deaths associated with human adenovirus-14p1 infections, Europe, 2009–2010. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 8, p. 1402-08, 2011.

CASHAT-CRUZ, M.; MORALES-AGUIRRE, J. J.; MENDOZA-AZPIRI, M. Respiratory tract infections in children in developing countries. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 84-92, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14—four states, 2006–2007. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 56, n. 45, p. 1181-4, 2007.

CHATTERJEE, P.K.; VAYDA, M.E.; FLINT, S.J. Adenoviral protein VII packages intracellular viral DNA throughout the early phase of infection. *The EMBO journal*, v. 5, n. 7, p. 1633–1644, 1986.

CHEN, Z.R.; JI, W.; WANG, Y.Q.; *et al.* Etiology of acute bronchiolitis and the relationship with meteorological conditions in hospitalized infants in China. *Journal of the Formosan Medical Association*, Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2012.12.013>, 2013.

CHITAMBAR, S.; GOPALKRISHNA, V.; CHHABRA P.; *et al.* Diversity in the enteric viruses detected in outbreaks of gastroenteritis from Mumbai, Western India. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 9, n. 3, p. 895-915, 2012.

COOPER, R.J.; HALLETT, R.; TULLO, A.B.; *et al.* The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiology and Infection*, v. 125, n. 2, p. 333-45, 2000.

CRAWFORD-MIKSZA L, SCHNURR D.P. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *Journal of Virology*, v. 70, n. 3, p.1836-1844, 1996.

CUSACK, S. Adenovirus complex structures. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 15, n. 2, p. 237-43, 2005.

DAHER, K.A.; SELSTED, M.E.; LEHRER, R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of Virology*, v. 60, n. 3, p. 1068-74, 1986.

DAWOOD, U.S.; NELSON, A.; WU, D.; *et al.* Disseminated adenovirus infection in kidney transplant recipient. *Nephrology*, v. 19, n. 1, p. 10-3, 2014.

de ALBUQUERQUE, M.C.; da SILVA, F.M.; SOARES, C.C.; *et al.* Adenoviruses isolated from civilian and military personnel in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 4, p. 233-6, 2003.

de MEZERVILLE, M.H.; TELLIER, R.; RICHARDSON, S.; *et al.* Adenoviral infections in pediatric transplant recipients: a hospital-based study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 25, n. 9, p. 815-8, 2006.

ENDERS, J. F.; BELL, J. A.; DINGLE, J. H.; *et al.* Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, v. 124, n. 3212, p. 119-20, 1956.

FADEN, H.; WILBY, M.; HAINER, Z.D.; *et al.* Pediatric adenovirus infection: relationship of clinical spectrum, seasonal distribution, and serotype. *Clinical Pediatrics*, v. 50, n. 6, p. 483-7, 2011.

FÉ, M.M.; MONTEIRO, A.J.; MOURA, F.E. Parainfluenza virus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 3, p. 192-7, 2008.

GARCÍA, J.; SOVERO, M.; LAGUNA-TORRES, V.A.; *et al.* Molecular characterization of adenovirus circulating in Central and South America during the 2006-2008 period. *Influenza Other Respiratory Viruses*. v. 3, n. 6, p. 337-30, 2009.

GREEN, M.; WOLD, W. S. M.; BRACKMANN, K.; *et al.* Studies on Early Proteins and Transformation Proteins of Human Adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, n. 44, n. 1, p. 467-69, 1980.

HARRACH, B.; BENKI, M.; BOTH, G.W.; *et al.* Adenoviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. *Virus Taxonomy*, 90^a Ed. San Diego: Elsevier, p. 125-141, 2011.

HATHERILL, M.; LEVIN, M.; LAWRENSON, J.; *et al.* Evolution of an adenovirus outbreak in a multidisciplinary children's hospital. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v. 40, n. 8, p. 449-54, 2004.

HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 85, n. 1, p. 183-8, 1954.

HILLEMANN, M.R. Efficacy of and indications for use of adenovirus vaccine. *American Journal Public Health Nations Health*, v. 48, p. 153-158, 1958.

HIROI, S.; MORIKAWA, S.; TAKAHASHI, K.; *et al.* Molecular epidemiology of human adenoviruses d associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. v. 66, n.5, p. 436-438, 2013.

HOKE, C.H. Jr; SNYDER, C.E. Jr. History of the restoration of adenovirus type 4 and type 7 vaccine, live oral (Adenovirus Vaccine) in the context of the Department of Defense acquisition system. *Vaccine*, v. 31, n. 12, p. 1623-32, 2013.

HUEBNER, R. J.; CASEY, M. J.; CHANOCK, R. M.; *et al.* Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3: sharing of tumor antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus type 7 tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 54, n. 2, p. 381-8, 1965.

HUMAR, A.; KUMAR, D.; MAZZULLI, T.; *et al.* A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, v. 5, n. 10, p. 2555-9, 2005.

JIN, Y.; ZHANG, R.F.; XIE, Z.P.; *et al.* Prevalence of adenovirus in children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *Virology Journal*, v. 10, p. 271, 2013.

KAJON, A.E.; PORTES, S.A.; de MELLO, W.A.; *et al.* Genome type analysis of Brazilian adenovirus strains of serotypes 1,2,3,5, and 7 collected between 1976 and 1995. *Journal of Medical Virology*, v. 58, n. 4, p. 408-12, 1999.

KAJON, A.E.; PORTES, S.A.; de MELLO, W.A.; *et al.* Genome type analysis of Brazilian adenovirus strains of serotypes 1,2,3,5, and 7 collected between 1976 and 1995. *Journal of Medical Virology*, v. 58, n. 4, p. 408-12, 1999.

KALU, S.U.; LOEFFELHOLZ, M.; BECK E.; *et al.* Persistence of adenovirus nucleic acids in nasopharyngeal secretions: a diagnostic conundrum. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 29, n. 8, p. 746-750, 2010.

KALYUZHNIY, O.; DI PAOLO, N.C.; SILVESTRY, M.; *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 14, p. 5483-8, 2008.

KANDEL, R.; SRINIVASAN, A.; D'AGATA, E.M.; *et al.* Outbreak of adenovirus type 4 infection in a long-term care facility for the elderly. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 31, n. 7, p. 755-7, 2010.

KHAMIS, F. A.; AL-KOBAISI, M. F.; AL-AREIMI, W. S.; *et al.* Epidemiology of Respiratory Virus Infections Among Infants and Young Children Admitted to Hospital in Oman. *Journal of Medical Virology*, v. 84, n. 8, p. 1323-9, 2012.

KIM, J.; KIM, P. H.; KIM, S.W.; *et al.* Enhancing the therapeutic efficacy of adenovirus in combination with biomaterials. *Biomaterials*, v. 33, n. 6, p. 1838-50, 2012.

KIM, J.K.; JEON, J.S.; KIM, J.W.; *et al.* Epidemiology of Respiratory Viral Infection Using Multiplex RT-PCR in Cheonan, Korea (2006-2010). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 267-73, 2013.

KIM, Y.J.; HONG, J.Y.; LEE, H.J.; *et al.* Genome Type Analysis of Adenovirus Types 3 and 7 Isolated during successive Outbreaks of Lower Respiratory Tract Infections in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 10, p. 4594-9, 2003.

KUNZ, A.N.; OTTOLINI, M. The role of adenovirus in respiratory tract infections. *Current Infectious Disease Reports*, v. 12, n. 2, p. 81-7, 2010.

KUSCHNER, R.A.; RUSSELL, K.L.; ABUJA, M.; *et al.* A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine*, v. 31, n. 28, p. 2963-71, 2013.

LAI, C.Y.; LEE, C. J.; LU, C.Y.; *et al.* Adenovirus serotype 3 and 7 infection with acute respiratory failure in children in Taiwan, 2010-2011. *Plos One*. v. 8, n. 1, e53614, 2013.

LAI, C.Y.; LEE, C.J.; LU, C.Y.; *et al.* Adenovirus serotype 3 and 7 infection with acute respiratory failure in children in Taiwan, 2010-2011. *Plos One*, v. 8, n. 1, p. e53614, 2013.

LARRAÑAGA, C.; MARTÍNEZ, H.J.; PALOMINO, M.A.; *et al.* Molecular characterization of hospital-acquired adenovirus infantile respiratory infection in Chile using species-specific PCR assays. *Journal of Clinical Virology*, v. 39, n. 3, p. 175-81, 2007.

LEBECK, M.G.; MCCARTHY, T.A.; CAPUANO, A.W.; *et al.* Emergent US adenovirus 3 strains associated with an epidemic and serious disease. *Journal of Clinical Virology*, v. 46, n. 4, p. 331-6, 2009.

LEE, J.; CHOI, E.H.; LEE, H.J. Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007). *Journal of Medical Virology*, v. 82, n. 4, p. 624-31, 2010.

LEEN AM, SILI U, VANIN EF.; *et al.* Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8+ T cells. *Blood*, v. 104, n. 8, p. 2432-40, 2004.

LESSLER, J.; REICH, N.G.; BROOKMEYER, R.; *et al.* Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, v.9, n. 5, p. 291-300, 2009.

LIU, G.Q.; BABISS, L.E.; VOLKERT, F.C.; *et al.* A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. *Journal of Virology*, v. 53, n. 3, p. 920-925, 1985.

LU, X.; ERDMAN, D.D. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Archives of Virology*. v. 151, n. 8, p. 1587-1602, 2006.

LUIZ, L. N.; LEITE, J. P.; YOKOSAWA, J.; *et al.* Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 5, p. 712-6, 2010.

MA, H.C; HEARING, P. Adenovirus structural protein IIIa is involved in the serotype specificity of viral DNA packaging. *Journal of Virology*, v. 85, n. 15, p. 7849-55, 2011.

MACKEY, J. K.; RIGDEN, P. M.; GREEN, M. Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, n. 12, p. 4657-61, 1976.

MANGEL, W.F.; TOLEDO, D.L.; BROWN, M.T.; *et al.* Characterization of three components of human adenovirus proteinase activity *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 1, p. 536–543, 1996.

MARCONE, D.N.; ELLIS, A.; VIDELA, C.; *et al.* Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 33, n. 3, p. e105-10, 2013.

MARINHEIRO, J.C. Variabilidade genética de adenovírus humano da espécie B, associados a casos de infecção respiratórias agudas, em São Paulo. 121f. *Tese* (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MCCARTHY, T.; LEBECK, M.G.; CAPUANO, A.W.; *et al.* Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *Journal of Clinical Virology*, v. 46, n. 1, p.80–4, 2009.

MCCARTHY, T.; LEBECK, M.G.; CAPUANO, A.W.; *et al.* Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *Journal of Clinical Virology*, v. 46, n. 1, p.80–4, 2009.

MESQUITA, J.R.L. Perfil clínico-epidemiológico de infecções respiratórias agudas causadas por adenovírus em crianças atendidas em hospital de referências da cidade de Fortaleza – CE. 2007. 127f. *Dissertação* (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MORAES, M.T.; LEITE, J.P.; SIQUEIRA, M.M.; *et al.* Genomic characterization of adenovirus serotype 7 isolated in Brazil from acute respiratory disease patients during the period from 1980 to 1991. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 39, n. 4, p. 185-9, 1997.

MOURA FE, PERDIGÃO AC, RIBEIRO JF.; *et al.* Respiratory syncytial virus epidemic periods in na equatorial city of Brazil. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 6, p. 1128-35, 2013.

MOURA, F. E.; NUNES, I. F.; SILVA, G. B Jr.; *et al.* Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, n. 1, p. 165-7, 2006.

MOURA, F.E.; MESQUITA, J.R.; PORTES, S.A.; *et al.* Antigenic and genomic characterization of adenovirus associated to respiratory infections in children living in Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 120, n. 8, pp. 937-41, 2007a.

MOURA, P.O.; ROBERTO, A.F.; HEIN, N.; *et al.* Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Virology*. v. 79, n. 2, p. 174-81, 2007b.

MYNAREK, M.; GANZENMUELLER, T.; MUELLER-HEINE, A. *et al.* Patient, virus, and treatment-related risk factors in pediatric adenovirus after stem cell transplantation: results of a routine monitoring program. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 20, n. 20, p. 250-6, 2014.

NAIR, H.; SIMÕES, E. A.; RUDAN, I.; *et al.* Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet*, v. 381, n. 9875, p. 1380-90, 2013.

NICKLIN, S. A.; WU, E.; NEMEROW, G. R.; *et al.* The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Molecular therapy*, v. 12, n. 3, p. 84-93, 2005.

NOYOLA, D.E.; MANDEVILLE, P.B. Effect of climatological factors on respiratory syncytial virus epidemics. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 10, p. 1328–32, 2008.

PALOMINO, M.A.; LARRAÑAGA, C.; AVENDAÑO, L.F. Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 19, n. 6, p. 527-31, 2000.

PHILIPSON, L.; LONBERG-HOLM, K.; PETTERSSON, U. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *Journal of Virology*, v. 2, n. 10, p. 1064-75, 1968.

PRETORIUS, M.A.; MADHI, S.A.; COHEN, C.; *et al.* Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay

in patients hospitalized with severe acute respiratory illness--South Africa, 2009-2010. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. S1, p. S159-65, 2012.

RANDALL, R.E.; GOODBOURN, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of General Virology*, v. 89, n. 1, p. 1-47, 2008.

REINA, J.; FERRES, F.; GUTIÉRREZ, O.; *et al.* Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). *Anales de Pediatría*, v. 61, n. 2, p. 137-42, 2004.

ROBINSON, C.M.; SINGH, G.; HENQUELL, C.; *et al.* Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology*. v. 409, n. 2, p. 141-7, 2011.

ROJAS, L.J.; JARAMILLO, C.A.; MOJICA M.F.; *et al.* Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian pediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiology and Infection*, v. 140, n. 5, p. 818-22, 2012.

ROSEN, L. A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *American Journal of Epidemiology*, v. 71, p. 120-8, 1960.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; *et al.* Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 84, n. 3, p. 570-3, 1953.

RUSSELL, K.L. HAWKSWORTH, A.W.; RYAN, M.A.K., *et al.* Vaccine preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine.*, v. 24, p. 2835-42, 2006.

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

RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. *The Journal of General Virology*, v. 81, n. 11, p. 2573-604, 2000.

RUUSKANEN, O.; MEURMAN, O.; AKUSJÄRVI, G. Adenoviruses. In: RICHMAN, D.D. *Clinical Virology*. Churchill Livingstone, p. 525-547, 1997

RUX, J.J.; BURNETT, R.M. Adenovirus structure. *Human Gene Therapy*. V. 15, n. 12, p. 1167-76, 2004.

SABAN, S.D.; SILVESTRY, M.; NEMEROW, G.R.; *et al.* Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *Journal of Virology*, v. 80, n. 24, p. 12049-59, 2006.

SAN MARTÍN, C. Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, v. 4, n. 5, p. 847-77, 2012.

SAN MARTÍN, C.; BURNETT, R.M. Structural studies on adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 275, p. 57-94, 2003.

SAQUIB, R.; MELTON, L.B. CHANDRAKANTAN, A. *et al.* Disseminated adenovirus infection in renal transplant recipients: the role of cidofovir and intravenous immunoglobulin. *Transplant Infectious Disease*, v. 12, n. 1, p. 77-83, 2010.

SARANTIS, H.; JOHNSON, G.; BROWN, M.; *et al.* Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p.3963–3969, 2004.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância de Síndrome respiratória aguda (SRAG), de síndrome gripal e de internações por CID J09 a J18. *Informe Técnico de Influenza*, v. 1, p. 1-15, 2012.

SHINANAGAWA, M.; MATSUDA, A.; ISHIYAMA, T.; SATO, G. A rapid and simple method for preparation of adenoviruses DNA from infected cells. *Microbiology and Immunology*. v. 27, n. 9, p.817-822, 1983.

SIMÕES, E. A. F.; CHERIAN, T.; CHOW, J.; *et al.* Acute Respiratory Infections in Children. In: JAMISON, D. T.; JOEL G BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; *et al.* (Ed). *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2^a Ed. Washington (DC): World Bank. p. 483-497, 2006.

SLOOTS, T. P.; WHILEY, D. M.; LAMBERT, S. B.; *et al.* Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases?. *Journal of Clinical Virology*, v. 42, n. 3, p. 233-43, 2008.

SMITH, J.G.; WIETHOFF, C.M.; STEWART, P.L.; *et al.* Adenovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 343, p. 195–224, 2010.

SOBEL, G.; ARONSON, B.; ARONSON, S.; *et al.* Pharyngoconjunctival fevers; report of an epidemic outbreak. *The American Journal of Diseases of Children*, v. 92, n. 6, p. 596-612, 1956.

STROPARO, E.; CRUZ, C.R.; DEBUR Mdo, C.; *et al.* Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 52, n. 6, p. 317-21, 2010.

SUMIDA, S.M.; TRUITT, D.M.; LEMCKERT, A.A.; *et al.* Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *Journal of immunology*, v. 174, n. 11, p. 7179-85, 2005.

SUN, Q.; JIANG, W.; CHEN, Z.; *et al.* Epidemiology and clinical features of respiratory adenoviral infections in children. *European Journal of Pediatrics*, v. 173, n. 4, p. 441-4, 2014.

TABAIN, I.; LJUBIN-STERNAK, S.; CEPIN-BOGOVIĆ, J.; *et al.* Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. v. 31, n. 7, p. 680-4, 2012.

TANG, L.; AN, J.; YU, P.; XU, W. Complete genome sequence of human adenovirus type 7 associated with fatal infant pneumonia. *Genome Announcements*, v. 1, n. 1, p. 1-2, 2013.

TARASSISHIN, L.; SZAWLOWSKI, P.; KIDD, A.H.; *et al.* An epitope on the adenovirus fibre tail is common to all human subgroups. *Archives of Virology*, v. 145, n. 4, p. 805-11, 2000.

TEBRUEGGE, M.; CURTIS, N. Adenovirus: an overview for pediatric infectious diseases specialists. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 31, n. 6, p. 626-7, 2012.

THAVAGNANAM, S.; CHRISTIE, S.N.; DOHERTY, G.M.; *et al.* Respiratory viral infection in lower airways of asymptomatic children. *Acta Paediatrica*, v. 99, n. 3, p. 394-398, 2010.

TOMKO, R.P.; XU, R.; PHILIPSON, L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 7, p. 3352-6, 1997.

TOP, F.H.; DUDDING, B.A.; RUSSELL, P.K. *et al.* Control of respiratory disease in recruits with types 4 and 7 adenovirus vaccines. *American Journal of Epidemiology*, v. 94, p. 142-146, 1971.

TREGONING, J. S.; SCHWARZE, J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 74-98, 2010.

TRENTIN, J. J.; YABE, Y.; TAYLOR, G. The quest for human cancer viruses. *Science*, v. 137, n. 3533, p. 835-41, 1962.

ULRYCH, E.E.; DZIECIATKOWSKI, T.; PRZYBYLSKI, M. *et al.* Disseminated adenovirus disease in immunocompromised patient successfully treated oral ribavarin: a case report. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 59, n. 6, p. 473-7, 2011.

VELLINGA, J.; VAN der HEIJDT, S.; HOEBEN, R.C. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *The Journal of General Virology*, v. 86, n. 6, p. 1581-8, 2005.

VORA, G.J.; LIN, B.; GRATWICK, K.; *et al.* Confections of adenovirus species in previously vaccinated patients. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 921-30, 2006.

WADDINGTON, S.N.; MCVEY, J.H.; BHELLA, D.; *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell*, v. 132, n. 3, p. 397-409, 2008.

WADELL, G. Classification of human adenoviruses by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. *Intervirology*, v. 11, n. 1, p. 47-57, 1979

WADELL, G.; VARSÁNYI, T. M.; LORD, A.; SUTTON, R. N. Epidemic outbreaks of adenovirus 7 with special reference to the pathogenicity of adenovirus genome type 7b. *American Journal of Epidemiology*, v. 112, n. 5, p. 619-28, 1980.

WANG, S.L.; CHI, C.Y.; KUO, P.H.; *et al.* High-incidence of human adenoviral co-infections in Taiwan. *Plos One*. v. 8, n. 9, e75208, 2013.

WHO (2013). Disease and injury regional mortality estimates, 2000-2011. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html [Acessado em 12/02/2014 às 14:30].

WIETHOFF, C.M.; WODRICH, H.; GERACE, L.; *et al.* Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of Virology*, v. 79, n. 4, p. 1992–2000, 2005.

WODRICH, H.; GUAN, T.; CINGOLANI, G.; *et al.* Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *The EMBO Journal*, v. 22, n. 23, p. 6245–6255, 2003.

WOLD, W. S. M.; HORWITZ, M. S. Adenoviruses. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. v. 2, p. 2397-2436, 2007.

YEUNG, R.; ESHAGHI, A.; LOMBOS, E.; *et al.* Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virology Journal*, v. 6, p. 11, 2009.

YUSUF, S.; PIEDIMONTE, G.; AUAIS, A.; *et al.* The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiology and Infection*, v. 135, n. 7, p. 1077-90, 2007.

ZOU, L.; ZHOU, J.; LI, H.; *et al.* Human adenovirus infection in children with acute respiratory tract disease in Guangzhou, China. *APMIS*. v. 120, n. 8, p.683-8, 2012.

ANEXOS

Anexo I - Parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
Fone/Fax: (85) 3101.4212 – 3101.4283

Of. Nº 13 /06

Fortaleza, 14 de fevereiro de 2006

Registro no CEP: 04 /06

Data da Aprovação: 13/02/06

Pesquisador responsável: Fernanda Edna Araújo Moura

Instituição / Serviço: Hospital Infantil Albert Sabin

Título do Projeto: “Análise antigênica e genômica de cepas de adenovírus causadores de infecção respiratórias agudas infantis em Fortaleza”.

Levamos ao conhecimento de V. S^a, que o **Comitê de Ética em Pesquisa – COMEPE**, do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, publicada no Diário Oficial da União em 16 de outubro de 1996, aprovou o projeto supra citado.

Dra. Ana Lúcia de Almeida Ramalho
Coord^a. do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo II - Termo de consentimento livre e esclarecido

ESTUDO: “Análise antigênica e genômica de cepas de adenovírus causadores de infecções respiratórias agudas infantis em Fortaleza”

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia-o atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

Eu , RG
 , abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a)
 nascido (a) em ____ / ____ / _____ , seja
 voluntário do estudo “Inclusão das crianças na faixa etária de 6 meses a 2 anos nas
 campanhas de vacinação de influenza: impacto dessa estratégia nas taxas de mortalidade
 e morbidade infantis”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas
 as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

Este estudo tem como objetivo avaliar o impacto da inclusão de crianças de seis meses a dois anos de idade nas campanhas de vacinação de influenza nas taxas de morbidade e mortalidade infantis em Fortaleza.

- I) Serão feitas coletas de secreção nasal do (a) meu (minha) filho (a);
- II) Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho (a); A coleta pode causar um leve desconforto, mas não prejudicará em nada meu (minha) filho (a)
- III) participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho(a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele(ela) estiver sendo submetido;

VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Fortaleza de de 20....

Paciente / Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Médico Responsável: _____

Prof. Responsável pelo Projeto: _____

Dra Fernanda Edna Araújo Moura

Anexo III – Ficha Epidemiológica

Ficha nº _____

Projeto de Pesquisa: **“Análise antigênica e genômica de cepas de adenovírus causadores de infecções respiratórias agudas infantis em Fortaleza”**

Responsável pela coleta: _____ Médico _____ Data da coleta: _____

Dados pessoais do paciente

Nome: _____ Sexo: () Masc () Fem

Data de nascimento: _____ Idade em meses: _____

Bairro: _____ Procedência: () Fortaleza () Outra (citar): _____

Pessoa p/ contato: _____ Telefone: _____

() Emergência () Observação () Ambulatório/Consultório () Enfermaria: Leito _____ Prontuário _____

Histórico do paciente

() Não mamou () Mamou < 6 m () Mamou ≥ 6 m () Ainda mama

Vacinação para influenza no ano de 2011 ou 2012: () Sim () Não / Pneumococo: () Sim () Não

Absenteísmo escolar: () Não () Sim, nº de dias: _____

Absenteísmo ao trabalho pela doença atual da criança? () Não () Sim, nº de dias: _____

Fator de risco: () Não () Fumante em casa () frequenta creche ou escola () não mamou () Prematuridade

Familiar com IRA em casa: () Não () Sim, identificar: _____

Comorbidade: () Cardiopatia () Pneumopatia congênita ou crônica () Doença neurológica

() Imunossupressão () Asma ou Bebê chiador () Doença do refluxo gastroesofágico

() Outros: _____

() O paciente nunca cansou Idade em que cansou pela 1ª vez: _____

História de cansaço na família: () Não () Pai () Mãe () Irmão(s) () Tio(s) () Avó(s)

Doença atual: Queixa principal: _____ Tempo de início de sintomas: _____

() Coriza () Obstrução nasal () Espirros () Tosse cheia () Febre () Anorexia () Vômitos () Diarreia

() Cansaço () Exantema () Conjuntivite () Convulsões () Cianose () BAN

Outros: _____

Exame físico: Peso: _____ Temp: _____ Freq resp: _____

Estado geral: () Bom () Gemente () Cianótico

Orofaringe: () Não examinada () Normal () Hiperemiada () Hipertrofia de amígdalas () Pontos purulentos

() Vesículas () Úlceras

Presença de tiragem: () Não () Intercostal () Supraclavicular () Subdiafragmática

Ausculta pulmonar: () Não realizada () Normal () Sibilos () Roncos () Estertores () Estridor

Raio-X de tórax: () Não solicitado () Normal () Condensação () Infiltrado intersticial

() Hiperinsuflação pulmonar () Outros: _____

Hipótese diagnóstica da doença atual: _____

Tratamento instituído pelo médico

Paciente fez uso de medicação no hospital durante o atendimento: () Não () Sim

() Antitérmico () Aerossol () Salbutamol () Corticoide () Adrenalina

() Outros: _____

Medicação prescrita para casa: () Não () Sim

() Antitérmico () Aerossol () Corticoide () Antibiótico

() Outra: _____

Destino do paciente: () Retornou p/ casa () Internamento no HIAS () Encaminhamento para outro hospital,

identificar o hospital: _____ () Óbito

Observações: _____

ARTIGO

Artigo

**Adenoviruses and acute respiratory infections in children living in an
equatorial area of Brazil**

Epidemiology and Infection



Samuel Arruda <arpsamuel@gmail.com>

Epidemiology and Infection - Decision on Manuscript ID HYG-OM-5650-Apr-14.R6

mark.zuckerman@kcl.ac.uk <mark.zuckerman@kcl.ac.uk>

15 de abril de 2015 10:32

Para: arpsamuel@gmail.com

Cc: Norman.Noah@lshtm.ac.uk, Veronika.Aurens@lshtm.ac.uk

15-Apr-2015

Dear Dr. Pereira,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Adenoviruses and acute respiratory infections in children living in an equatorial area of Brazil" in its current form for publication in *Epidemiology and Infection*.

Epidemiology and Infection offers authors the option to publish their article through an Open Access model (Cambridge Open Option, see <http://journals.cambridge.org/action/displaySpecialPage?pageId=4576> for details), on payment of a one-off fee of £1,695/\$2,700. If you wish to do this, please send an email stating this choice to veronika.aurens@lshtm.ac.uk and complete and return the alternative copyright transfer and order form which can be accessed by clicking the link below:

http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/HYG_ctf_oa.pdf

If you do NOT wish to publish your paper Open Access, please complete and return the standard copyright transfer form:

http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/HYG_ctf.pdf

On behalf of the Editors of *Epidemiology and Infection*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Yours sincerely,

Dr. Mark Zuckerman
Associate Editor
Epidemiology and Infection
mark.zuckerman@kcl.ac.uk



Adenoviruses and acute respiratory infections in children living in an equatorial area of Brazil

S. A. R. PEREIRA¹, C. M. G. D. FLORÊNCIO¹, J. C. MARINHEIRO²,
C. M. HÁRSI² AND F. E. A. MOURA^{1*}

¹*Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará (UFC), Brazil*

²*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brazil*

Received 17 April 2014; Final revision 27 March 2015; Accepted 15 April 2015

SUMMARY

Human adenoviruses (HAdVs) are important respiratory pathogens, found in 2–27% of acute respiratory infection (ARI) cases. Few studies have analysed the diversity of species and types of HAdVs associated with ARI in Brazil. The purpose of this study was to determine the circulation patterns of the different HAdV species and respective types associated with ARI in children in the city of Fortaleza, northeastern Brazil. HAdVs were screened by an indirect immunofluorescence assay, and subsequently identified as species and types by PCR and sequencing of the hexon gene (HVR1–HVR6). Between 2001 and 2013, a total of 290 HAdV strains were detected, 190 of which were identified as belonging to the HAdV-B, -C and -E species. Seven types of HAdVs circulated in the studied population during the analysed period, with HAdV-3 being predominant.

Key words: Adenoviruses, molecular epidemiology, respiratory infections, surveillance.