



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

JACÓ RICARTE LIMA DE MESQUITA

PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
CAUSADAS POR ADENOVÍRUS EM CRIANÇAS
ATENDIDAS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DA
CIDADE DE FORTALEZA - CE

FORTALEZA

2007

JACÓ RICARTE LIMA DE MESQUITA

PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE
INFECCÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
CAUSADAS POR ADENOVÍRUS EM CRIANÇAS
ATENDIDAS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DA
CIDADE DE FORTALEZA - CE

Dissertação submetida ao Curso 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.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura

FORTALEZA

2007

M544p Mesquita, Jacó Ricarte Lima de
Perfil clínico-epidemiológico de infecções respiratórias agudas causadas por adenovírus em crianças atendidas em hospital de referência da cidade de Fortaleza-Ce: / Jacó Ricarte Lima de Mesquita. – Fortaleza, 2007.
127f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Fortaleza-Ce, 2007.

1. Infecções respiratórias 2. Adenovírus humano. 3. Criança. I. Moura, Fernanda Edna Araújo (orient.). II. Título.

CDD: 618.922

JACÓ RICARTE LIMA DE MESQUITA

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS
AGUDAS CAUSADAS POR ADENOVÍRUS EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DA CIDADE DE FORTALEZA - CE**

Dissertação submetida ao Curso 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.

Aprovada em 01/06/2007

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Edna Araújo Moura (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Estadual do Ceará

Dra. Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão
Universidade Federal do Ceará

Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, pela formação ética, moral, espiritual e intelectual que me proporcionaram, e por todo o apoio que me deram ao longo de toda a minha vida.

Aos demais membros da minha família, pelo carinho e dedicação.

Aos meus amigos, por toda a paciência, compreensão e torcida ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo constante empenho na melhoria do curso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura, por todo o conhecimento incansavelmente transmitido.

Ao professor Dr. André Jalles Monteiro, pela análise estatística dos dados do estudo.

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos tão brilhantemente repassados.

À professora do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, pela disponibilidade em repassar conhecimentos teóricos.

À professora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pelo constante repasse de conhecimentos práticos.

À diretora da Biblioteca de Ciências da Saúde – UFC, Norma de Carvalho Linhares, pelo auxílio com a normalização desta dissertação.

Aos meus colegas de curso, pelo apoio e incentivo.

À aluna do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Mariana Mota Moura Fé, pela ajuda com o banco de dados.

À aluna do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Joyce Fonteles Ribeiro, pela colaboração em várias etapas da parte experimental.

Aos estagiários do Laboratório de Virologia: Manoel Dogival Constantino da Silva e Natanael Pinheiro Leitão Jr, pela ajuda com a cultura de células e isolamento viral.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Virologia: Aléssia Queiroz de Freitas, Anne Caroline Bezerra Perdigão, Emanuelle Martins, Luana Albuquerque Dias, Mariana Ribeiro Onofre, Nádia Gurgel, Natássia Pinheiro de Lavor, Neiberg de Alcântara Lima, Paulo Renan Lima Teixeira, pela coleta e processamento de amostras.

Ao aluno de graduação Henrique Rodrigues, pela revisão ortográfica e pela ajuda com a formatação do texto.

Ao técnico em informática Francisco das Chagas Gadelha Mota, pela ajuda com a formatação do texto.

Aos técnicos do Departamento de Patologia e Medicina Legal: José Olavo Moraes, Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues, José Everardo Araújo de Sousa, pelo auxílio com o preparo de meios de cultura.

À secretária do curso, Marta Maria de Vasconcelos, pelo empenho na resolução de problemas burocráticos.

Ao Laboratório de Vírus Respiratórios da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Rio de Janeiro, na pessoa da Dra. Marilda Mendonça Siqueira, pelo fornecimento das linhagens celulares e reagentes.

À Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), do Ministério da Saúde do Brasil, pelo envio dos kits de imunofluorescência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os adenovírus (Ad) são agentes importantes de infecções respiratórias agudas (IRAs) em crianças, especialmente entre seis meses e cinco anos de idade. Este foi um estudo retrospectivo que teve como objetivos: estabelecer o perfil epidemiológico e clínico das infecções respiratórias agudas causadas por Ad em crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin, na cidade de Fortaleza, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006; observar a frequência de detecção de Ad em casos de IRAs em crianças atendidas nesse hospital; descrever as principais características clínicas das infecções respiratórias causadas por Ad; pesquisar a existência de padrão de sazonalidade do Ad na cidade de Fortaleza; determinar a taxa de isolamento do Ad em cultura de células HEp-2 inoculadas com amostras de secreções de nasofaringe (SNF) consideradas positivas para Ad por imunofluorescência indireta (IFI); e criar um banco de cepas de Ad para futuros estudos sobre diversidade antigênica e genômica desses agentes. Foram coletadas nesse período, amostras de SNF de 3070 crianças com até sete dias de sintomas de IRA. Todas as amostras foram submetidas a IFI e, dessas, 54 se mostraram positivas para Ad. Quarenta e uma dessas amostras positivas foram inoculadas em monocamadas de células HEp-2, obtendo-se isolamento viral em 32 delas. Outras 103 amostras negativas por IFI, escolhidas aleatoriamente, foram inoculadas, resultando em três isolamentos adicionais, totalizando 57 casos confirmados de infecção por Ad. A frequência de detecção de Ad foi de 1,86% em relação ao total de casos de IRAs e 6,1% das IRAs virais. Não foi observado um padrão de sazonalidade nem correlação com período chuvoso ou seco. A maior parte das IRAs por Ad ocorreu em crianças na faixa etária entre sete e 24 meses com 63,15% dos casos. As IRAs por Ad foram observadas principalmente em crianças atendidas em ambulatórios (50,88%), e o diagnóstico predominante foi a infecção de vias aéreas superiores (70,18%). Os principais sintomas e sinais apresentados pelos pacientes com IRA por Ad foram febre, tosse, coriza, anorexia, vômitos e/ou diarreia, obstrução nasal e dispnéia. A principal conduta terapêutica aplicada em casos de IRAs por Ad foi o uso de aerossol / salbutamol (42,11%).

Palavras-chave: infecções respiratórias, adenovírus humano, criança, epidemiologia.

ABSTRACT

Adenoviruses (Ad) are important etiological agents of acute respiratory infections (ARI) in children, particularly between six months and five years old. This was a retrospective study, whose objectives were: to perform clinical and epidemiologic profile of adenoviral respiratory infections in children attended in Hospital Infantil Albert Sabin, in the city of Fortaleza, from January 2001 to December 2006; to observe the detection frequency of Ad in cases of ARI in children attended in that hospital; to describe the main clinical features of adenoviral respiratory infections; to search for the existence of a seasonal pattern of adenoviral infections in the city of Fortaleza; to determine the isolation rate of Ad in HEp-2 cell lines inoculated with samples of nasopharyngeal secretions (NPS) considered positive to Ad by indirect immunofluorescence (IIF); and to create a collection of Ad strains for future studies on antigenic and genomic diversity of these agents. NPS samples of 3,070 children with ARI up to seven days of the onset of symptoms were collected. IIF was applied to all of the samples, and among them, 54 were positive to Ad. Forty one of those positive samples were inoculated into HEp-2 cells, resulting in 32 viral isolations. Other 103 randomly chosen negative samples were also inoculated, resulting in more three isolations, reaching the number of 57 confirmed cases of Ad infections. The detection frequency of Ad was 1.86% of total number of cases of ARI and 6.1% of cases of viral ARI. It was not observed any seasonal pattern or correlation to rainy or dry season. Most cases of adenoviral ARI occurred in children aged seven to 24 months, representing 63.15% of cases. Ad ARI was observed mainly in children attended in the out-patient facility (50.88%), and the predominant diagnosis was upper respiratory tract infection (70.18%). The main clinical features in Ad patients were fever, cough, rhinorrhea, anorexia, vomiting or diarrhea, nasal obstruction, and dyspnea. The main therapeutic management for Ad patients was use of nebulization (about 42% of patients).

Key-words: Respiratory tract infections, human adenovirus, child, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Representação esquemática de uma partícula de adenovírus. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov (modificado) 21
- FIGURA 2 – Padrão de transcrição do genoma do adenovírus. Fonte: Ruuskanen; Meurman; Akusjärvi, 1997 (modificado) 22
- FIGURA 3 – Representação esquemática do ciclo de replicação do adenovírus. Fonte: Ruuskanen; Meurman; Akusjärvi, 1997 (modificado)..... 23
- FIGURA 4 – Demonstração da técnica de coleta de secreção de nasofaringe. Fonte: acervo pessoal 37
- FIGURA 5 – Visualização de amostra positiva para adenovírus à microscopia de imunofluorescência. As células positivas apresentam fluorescência citoplasmática e/ou nuclear (setas) e as células negativas apresentam-se coradas em vermelho. Fonte: acervo pessoal 39
- FIGURA 6 – Distribuição por idade e sexo dos pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 44
- FIGURA 7 – Distribuição mensal dos casos de infecções respiratórias agudas por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006..... 48
- FIGURA 8 – Relação entre número de casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001-2006) 49
- FIGURA 9 – Relação entre número de casos de infecções respiratórias agudas por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001-2006)..... 50

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Sorotipos e espécies de Ad humanos.....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição anual dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	41
TABELA 2 – Distribuição mensal acumulada dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	42
TABELA 3 – Características demográficas dos pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	43
TABELA 4 – Distribuição anual dos casos de infecções respiratórias agudas, infecções respiratórias virais e infecções respiratórias por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	45
TABELA 5 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 segundo o resultado da imunofluorescência.....	46
TABELA 6 – Isolamento de adenovírus em pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 a partir de amostras positivas por imunofluorescência indireta de acordo com o ano de coleta.....	47
TABELA 7 - Correlação do total de casos de infecções respiratórias agudas e os casos positivos para cada vírus, dentre os mais frequentemente detectados, em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	51
TABELA 8 - Correlação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	51
TABELA 9 – Características demográficas dos pacientes com infecções respiratórias agudas por adenovírus atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.....	53
TABELA 10 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de fatores de risco.....	54
TABELA 11 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de co-morbidades	54
TABELA 12 – Distribuição das síndromes clínicas em casos de infecções respiratórias agudas causadas por adenovírus e em casos negativos para este vírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	55

TABELA 13 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os casos negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de IVAS em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	56
TABELA 14 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de bronquiolite em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	56
TABELA 15 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de pneumonia em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	57
TABELA 16 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas e de infecções respiratórias por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de sinais e sintomas	58
TABELA 17 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à presença de conjuntivite em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	59
TABELA 18 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à presença de exantema em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	59
TABELA 19 – Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à ausculta pulmonar em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	60
TABELA 20 – Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao uso de aerossol / salbutamol em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ad – Adenovírus

AIDS – Síndrome de imunodeficiência adquirida

ARI – Acute respiratory infection

CAR – Receptor de coxsackie e adenovírus

CPE – Cytopathic effect

CPHO – Centro Pediátrico Hosanah de Oliveira

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPML – Departamento de Patologia e Medicina Legal

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

ECP – Efeito citopático

FBS – Fetal bovine serum

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Flu A – Vírus influenza A

Flu B – Vírus influenza B

FUNCEME – Fundação Cearense de Meteorologia

HeLa – Linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano

HEp-2 – Linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo humano

HIAS – Hospital Infantil Albert Sabin

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFA – Indirect immunofluorescence assay

IFI – Imunofluorescência indireta

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IRAs – Infecções respiratórias agudas

IVAI – Infecções de vias aéreas inferiores

IVAS – Infecções de vias aéreas superiores

LRTI – Lower respiratory tract infection

MEM-E – Meio essencial mínimo com sais de Earle

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MRC5 – Linhagem celular composta por fibroblastos pulmonares embrionários humanos

NPA – Nasopharyngeal aspirates

PBS – Tampão salina fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

REA – Restriction endonuclease analysis

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RSV – Respiratory syncytial virus

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SBF – Soro bovino fetal

SNF – Secreção de nasofaringe

Th2 – Células T auxiliares tipo 2

TMO – Transplante de medula óssea

TNF – Fator de necrose tumoral

URTI – Upper respiratory tract infection

UTI – Unidade de terapia intensiva

VSR – Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Infecções Respiratórias Agudas Infantis	17
1.2 Infecções Respiratórias Agudas por Adenovírus em Crianças	18
1.3 Adenovírus	19
1.3.1 Histórico	19
1.3.2 Classificação dos Adenovírus.....	19
1.3.3 Estrutura dos Adenovírus	21
1.3.4 Replicação	22
1.3.5 Patogênese	24
1.3.6 Imunidade	24
1.3.7 Epidemiologia.....	25
1.3.8 Manifestações Clínicas	26
1.3.8.1 Infecções de Vias Aéreas Superiores.....	26
1.3.8.2 Infecções de Vias Aéreas Inferiores	27
1.3.8.2.1 Sequelas de Infecções por Adenovírus.....	27
1.3.8.3 Outras Síndromes Clínicas	28
1.3.8.3.1 Infecção em Recém-nascidos	28
1.3.8.3.2 Gastrenterite.....	28
1.3.8.3.3 Infecção em Pacientes Imunocomprometidos	29
1.3.8.3.4 Infecção em Recrutas Militares	29
1.3.8.3.5 Ceratoconjuntivite Epidêmica	29
1.3.9 Diagnóstico Laboratorial	30
1.3.9.1 Isolamento Viral	30
1.3.9.2 Detecção de Antígenos	30
1.3.9.3 Detecção de Ácidos Nucléicos	31
1.3.10 Tratamento e Prevenção	31
1.4. Justificativa do Estudo.....	32
1.5. Pergunta de Partida.....	32
1.6. Hipóteses	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35

3.1 Descrição do Estudo	35
3.1.1 Local do Estudo	35
3.1.2 Tipo de Estudo.....	35
3.1.3 População Estudada.....	35
3.1.4 Critérios de Definição de IRAs	36
3.2 Coleta de Dados.....	36
3.2.1 Coleta das Amostras	36
3.2.2 Entrevista e Preenchimento da Ficha Epidemiológica	37
3.2.3 Dados de Pluviometria.....	37
3.2.4 Questões Éticas.....	37
3.3 Processamento das Amostras.....	38
3.4 Métodos Diagnósticos Utilizados.....	38
3.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta	38
3.4.2 Isolamento Viral	39
3.5 Análise Estatística dos Dados.....	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Distribuição Anual e Mensal das IRAs no Período de Estudo	41
4.2 Caracterização Demográfica da População de Estudo	42
4.3 Frequência das IRAs Virais	44
4.4 Diagnóstico Laboratorial das IRAs Virais.....	45
4.4.1 Imunofluorescência Indireta	45
4.4.2 Isolamento Viral	46
4.5 Características Epidemiológicas das Infecções por Ad.....	47
4.5.1 Distribuição Mensal de Casos	47
4.5.2 Relação entre Infecções por Ad e Índices Pluviométricos	48
4.5.3 Correlação dos Casos de IRA por Ad com os Casos Totais de IRA e com os Casos de IRA por Outros Vírus	50
4.5.4 Sexo	52
4.5.5 Idade	52
4.5.6 Setor de Atendimento dos Pacientes	52
4.5.7 Fatores de Risco e Co-morbidades	53
4.6 Características Clínicas.....	55
4.6.1 Síndromes Clínicas	55
4.6.2 Sintomas e Sinais.....	57
4.6.3 Alterações à Ausculta Pulmonar	60

4.6.4 Alterações Radiológicas	60
4.6.5 Tratamento.....	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	88
ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Respiratórias Agudas Infantis

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são a mais freqüente causa de procura aos serviços de saúde em todo o mundo (CASHAT-CRUZ; MORALES-AGUIRRE; MENDOZA-AZPIRI, 2005), e representam em seu conjunto uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em populações humanas, sobretudo nos extremos de idade (SHEK; LEE, 2003). As IRAs representam um dos principais problemas de saúde entre crianças abaixo de cinco anos de idade e, na região das Américas, permanecem como uma das cinco principais causas de morte nessa faixa etária (Pan American Health Organization, 2007). As taxas de mortalidade devidas a IRAs diferem bastante entre os países desse continente, e mais ainda quando se comparam os países desenvolvidos com aqueles em desenvolvimento. A percentagem de mortes atribuídas a IRAs nessa faixa etária variam de 2% em Trinidad e Tobago a 16% no Paraguai, enquanto em países como Canadá e Estados Unidos essas taxas são de 2% (CASHAT-CRUZ; MORALES-AGUIRRE; MENDOZA-AZPIRI, 2005).

No Brasil, entre 1990 e 2003 houve uma redução na mortalidade proporcional por IRA em crianças menores de cinco anos de idade, caindo de 10,32% para 5,72%, com pequena variação entre as regiões, sendo que os maiores percentuais se encontram no Norte (7,03%) e os menores no Centro-Oeste (5,23%) (Brasil, 2007).

Vários fatores de risco para aquisição de IRAs em países em desenvolvimento já foram descritos, como fatores sociais (viver em condições de pobreza com rendimentos familiares restritos, baixo nível educacional dos pais); fatores ambientais (fumaça de cigarro ou fumaça de fogão à lenha dentro de casa); e fatores relacionados à própria criança, tais como baixo peso ao nascer, desnutrição com deficiência de micronutrientes (vitamina A, zinco), e ausência de aleitamento materno (CASHAT-CRUZ; MORALES-AGUIRRE; MENDOZA-AZPIRI, 2005).

Todas as classes de microrganismos podem ser incluídas entre os agentes etiológicos de IRAs, embora bactérias e vírus, esses últimos em especial, sejam os agentes mais freqüentes dessas infecções (CASHAT-CRUZ; MORALES-AGUIRRE; MENDOZA-AZPIRI, 2005; WESSELS, 1998).

A freqüência de detecção viral nessas infecções, segundo vários estudos, é bastante variável, com taxas que oscilam entre 25,9% a 39,7%, sendo essa variabilidade dependente de diversos fatores como faixa etária e setor de procedência dos pacientes, síndrome clínica avaliada, período de estudos e método(s) diagnóstico (s) utilizados (KIM; LEE; LEE, 2000; LIN *et al.*, 2004; STRALIOTTO *et al.*, 2002). Numerosos estudos

ressaltam a importância dos vírus como causa frequente de infecções de vias aéreas superiores (IVAS) (LEGG *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2004), bem como pela grande maioria das infecções de vias aéreas inferiores (IVAI) em crianças, particularmente entre as mais jovens (CARBALLAL *et al.*, 2001; CROWE; WILLIAMS, 2003; HIJAZI *et al.*, 1996; JUVÉN *et al.*, 2000; KLIIG *et al.*, 2002). Os principais vírus envolvidos em IRAs são o rinovírus, que pode responder por até 29,6% dos casos (COSTA *et al.*, 2006), os enterovírus, com 12,7% a 22,2% dos casos (LIN *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2001), o vírus sincicial respiratório (VSR), com taxas que podem variar de 1,7% a 27,2% (COSTA *et al.*, 2006; STRALIOTTO *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2001), metapneumovírus com 6,9% a 16,2% dos casos (ORDÁS *et al.*, 2006; REGEV *et al.*, 2006), vírus influenza (Flu) A e B, com detecção de 1,5% a 9,5%, adenovírus (Ad), em 3,7% a 7,7% dos casos, e vírus parainfluenza, representando 1,9% a 6,3% dos casos (COSTA *et al.*, 2006; STRALIOTTO *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2001).

1.2 Infecções Respiratórias Agudas por Adenovírus em Crianças

Os Ad são responsáveis por um amplo espectro de doenças em crianças, que podem variar de leves, ou mesmo assintomáticas, até infecções graves e algumas vezes fatais (MITCHELL *et al.*, 2000). A maioria das infecções ocorre em crianças entre seis meses e cinco anos de idade e são, geralmente, autolimitadas. Manifestam-se comumente com sintomas respiratórios, gastrintestinais, ou uma combinação dos dois (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). As diferentes síndromes clínicas resultantes da infecção pelo Ad dependem do sorotipo viral e do estado imunológico do hospedeiro (CHUANG *et al.*, 2003). Dentre as infecções respiratórias os Ad têm sido implicados em 5 a 11% das IVAS, 4 a 10% das faringites, 3 a 9% dos casos de crupe, 5 a 11% das bronquites, 2 a 10% das bronquiolites e 4 a 10% das pneumonias (MITCHELL *et al.*, 2000). As infecções por Ad podem ainda simular infecções bacterianas com febre elevada e de longa duração, quadro clínico-radiológico grave e leucocitose com desvio à esquerda (DALMÁS *et al.*, 2003). As faringites por Ad em crianças pequenas, também podem mimetizar infecções bacterianas graves, devido à febre elevada e aos resultados de exames laboratoriais, como leucocitose e elevação da concentração de proteína C reativa (DOMINGUEZ *et al.*, 2005). Alguns fatores do hospedeiro podem contribuir para a gravidade da doença, como desnutrição, anomalias anatômicas, doenças metabólicas ou genéticas, doenças cardíacas ou pulmonares crônicas, e deficiências imunológicas (FARNG *et al.*, 2002).

Ad tem sido identificado como um importante patógeno de IVAI (KLIIG, 2002), cujos quadros graves podem ser acompanhados por manifestações extrapulmonares, incluindo

meningoencefalite, miocardite, envolvimento renal, hepatomegalia, tendência hemorrágica, edema periférico, gastroenterite e exantema (FARNG *et al.*, 2002).

Ad são também responsáveis por surtos hospitalares de IRAs, principalmente em Unidades de terapia intensiva (UTI) neonatais e enfermarias de doenças crônicas, com taxas de mortalidade que vão de 0% a 39% (FADEN *et al.*, 2005; HATHERILL *et al.*, 2004).

1.3 Adenovírus

1.3.1 Histórico

Os Ad foram primeiramente isolados e caracterizados como agentes virais por dois grupos de pesquisadores que estudavam a etiologia de IRAs. Em 1953, Rowe e colaboradores observaram a degeneração de culturas de células primárias de adenóides humanas, resultante da replicação de um vírus não identificado presente nesse tecido. Em 1954, Hilleman e Werner, estudando a epidemia da doença respiratória em recrutas, isolaram agentes das secreções respiratórias que induziam alterações citopáticas em cultura de células humanas. Esses vírus foram logo relacionados e inicialmente chamados de agentes da degeneração da adenóide, da infecção respiratória, da doença da adenóide-faringe-conjuntiva ou da doença respiratória aguda. Apenas em 1956, foram denominados adenovírus, devido ao tecido no qual foram descobertos (SHENK, 1996).

Ao longo da segunda metade do século XX o Ad tornou-se um importante modelo para a elucidação de aspectos fundamentais da expressão gênica em células de mamíferos, e, recentemente, tornou-se um dos mais eficientes vetores para transferência gênica, com potencial aplicação em terapia gênica de doenças genéticas, tratamento de câncer e vacinação (CUSACK, 2005).

1.3.2 Classificação dos Adenovírus

Os adenovírus (Ad) pertencem à família *Adenoviridae*, que é dividida em dois gêneros: *Aviadenovirus*, que infecta somente aves, e *Mastadenovirus*, que inclui Ad de humanos, símios, bovinos, eqüinos, suínos, ovinos e caninos. Embora exista reatividade antigênica cruzada entre membros dentro de cada gênero devido a epítomos conservados localizados na proteína do héxon, não há nenhum antígeno conhecido comum a todos os adenovírus (SHENK, 1996). Os Ad podem ser agrupados em sorotipos por meio de testes de soroneutralização que utilizam anticorpos dirigidos contra as duas principais proteínas do capsídeo, o héxon e a fibra (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Há, até o momento, 51 sorotipos reconhecidos de Ad que infectam os seres humanos e são classificados em seis espécies (anteriormente denominados subgrupos) de A a F (Quadro 1), de acordo com

características como hemaglutinação, percentual das bases nitrogenadas citosina e guanina, potencial oncogênico em roedores, grau de homologia do DNA e análise do genoma por endonucleases de restrição (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003).

QUADRO 1 – Sorotipos e espécies de Ad humanos

Espécie	Sorotipo	Sítio de infecção
A	12, 18, 31	Doença respiratória, urinária e gastrointestinal; meningoencefalite
B:1	3, 7, 16, 21, 50	Doença respiratória, ocular, urinária e gastrointestinal
B:2	11, 14, 34, 35	Doença respiratória, gastrointestinal e urinária
C	1, 2, 5, 6	Doença respiratória, urinária e gastrointestinal
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Doença ocular e gastrointestinal
E	4	Doença ocular e respiratória
F	40, 41	Doença gastrointestinal. Doença respiratória (?)

Adaptado de Walls; Shankar; Shingadia (2003)

Cada sorotipo de Ad pode ser dividido em genotipos baseado nos padrões de digestão de seus DNAs com a utilização de endonucleases de restrição. Os genotipos podem variar geograficamente e temporalmente com relação a seu isolamento e podem ser marcadores úteis para estudos epidemiológicos (KIM *et al.*, 2003). Tem sido sugerido, ainda, que alguns genotipos podem estar associados com maior virulência (CARBALLAL *et al.*, 2001; LARRAÑAGA *et al.*, 2000). Há diferentes sistemas para classificar ou denominar os genotipos. Um sistema proposto por Adrian, Best e Wigand (1985) utiliza um código numérico que requer a realização de análise de restrição com um conjunto de sete endonucleases. Os padrões de restrição encontrados para cada enzima são denominados “1” para a cepa protótipo e “2”, “3”, “4” etc para os padrões diferentes daqueles. Assim, a cepa protótipo de um dado sorotipo tem um código “111111” e é referida como “P”, por exemplo, Ad6/P. Qualquer desvio desse perfil significa uma variante genômica, denominada “1”, “2” e assim por diante, por exemplo, Ad6/1, Ad6/2, etc. Esse sistema tem-se mostrado útil para a denominação dos genotipos da espécie C. No sistema proposto por Li e Wadell (1986) as cepas protótipo são designadas “p”, e as cepas que pertencem ao mesmo sorotipo mas que têm diferentes padrões de digestão pela enzima *Bam*HI são designadas “a”, “b”, “c” e assim por diante. Um numeral arábico é acrescentado após essas letras para descrever os diferentes genotipos distinguidos pelo uso de enzimas de restrição adicionais (por ex. Ad3p, Ad3p1).

1.3.3 Estrutura dos Adenovírus

Os Ad são vírus não-envelopados, com simetria icosaédrica (20 faces triangulares e 12 vértices), e diâmetro de 70 a 100 nm. Os vírions contêm DNA (13% de massa), proteína (87% de massa) e traços de carboidratos, e consistem de um cerne contendo DNA circundado por uma capa protéica (capsídeo) (SHENK, 1996). O capsídeo viral consiste de 252 capsômeros: 240 héxons formam as faces do icosaedro e 12 péntons formam os vértices. Os péntons são formados por duas estruturas: a base, que tem a função de ancorar o pénton ao capsídeo, e a fibra, que forma uma estrutura alongada que se projeta a partir do vértice (Figura 1).

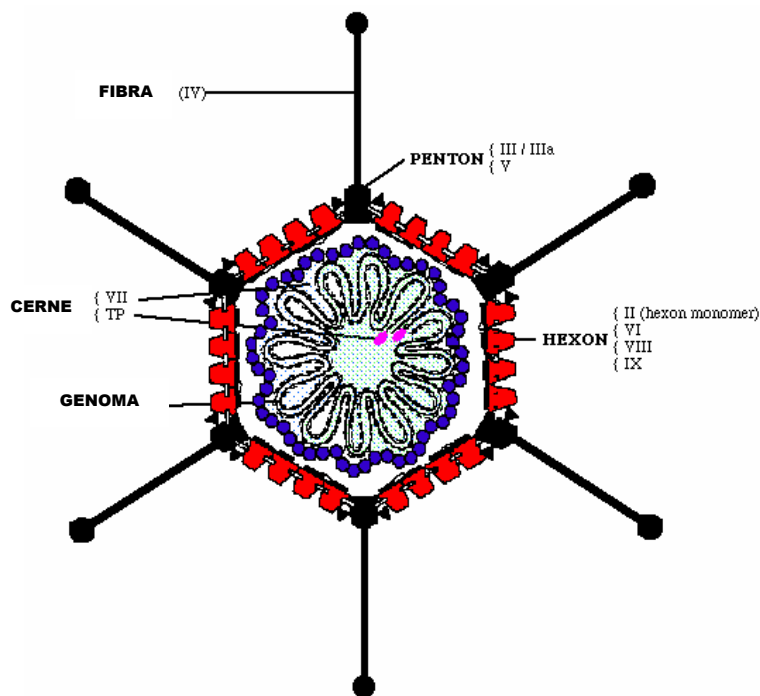


FIGURA 1 – Representação esquemática de uma partícula de adenovírus. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov (adaptado)

O genoma viral consiste de uma molécula de DNA linear de dupla fita com aproximadamente 35.000 pares de bases. O DNA viral codifica um total de oito diferentes unidades transcricionais (Figura 2), cinco que estão ativas precocemente após a infecção (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas que se tornam ativas numa fase intermediária (pIX e IVa2) e uma na fase tardia da infecção (unidade transcricional tardia principal) (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Muitas das unidades transcricionais individuais do Ad codificam uma série de polipeptídeos com funções relacionadas. A unidade E1A codifica duas proteínas que ativam a transcrição e induzem a célula hospedeira a entrar na fase S do ciclo celular; E1B codifica duas proteínas que cooperam com os produtos de E1A para induzir o crescimento celular; E2 codifica três proteínas diferentes, todas atuando na

replicação do DNA; E3 codifica produtos que modulam a resposta do hospedeiro à infecção pelo Ad; e a família tardia de RNAm está relacionada com a produção e montagem dos componentes do capsídeo. Apenas a unidade E4 codifica um conjunto aparentemente díspar de funções, mediando regulação transcricional, transporte de RNAm, e replicação de DNA (SHENK, 1996).

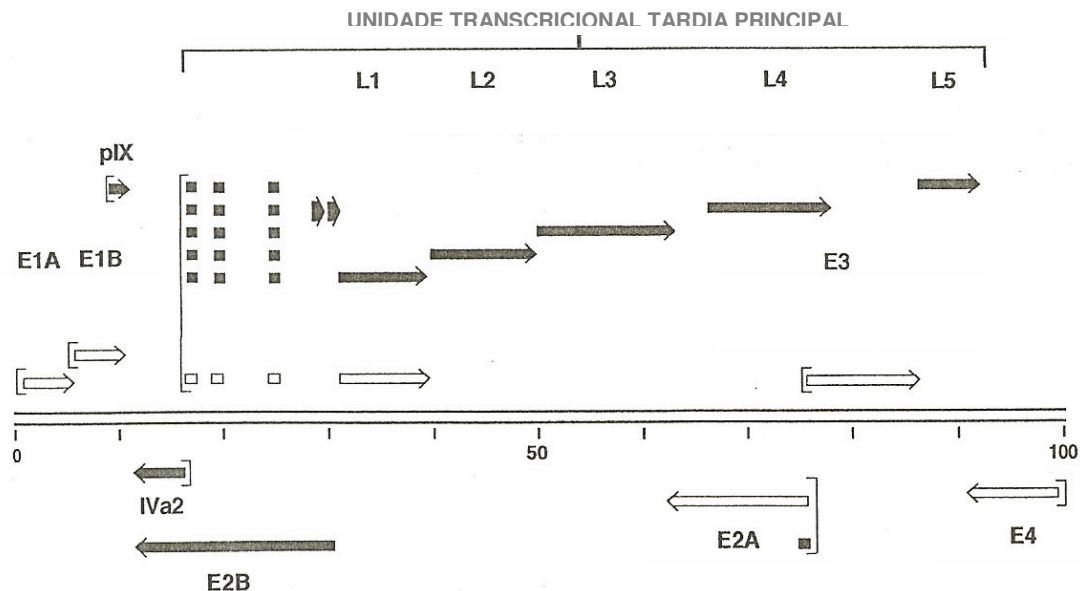


FIGURA 2 – Padrão de transcrição do genoma do adenovírus. Fonte: Ruuskanen; Meurman; Akusjärvi, 1997 (adaptado).

1.3.4 Replicação

O ciclo de replicação do Ad é dividido por convenção em duas fases: os eventos precoces que se iniciam tão logo os vírus interajam com a célula hospedeira, e incluem as etapas de adsorção, penetração, transcrição e tradução de um conjunto inicial de genes; e a fase tardia do ciclo que começa concomitantemente com o início da replicação do DNA viral, com a expressão de um novo conjunto de genes virais tardios e montagem dos vírions nascentes (Figura 3) (SHENK, 1996).

A infecção se inicia com a formação de um complexo de alta afinidade entre o domínio presente na fibra viral e um receptor na superfície da célula hospedeira (BEWLEY *et al.*, 1999). Para a maioria dos sorotipos de Ad (exceto para a espécie B e alguns sorotipos da espécie D) esse receptor é uma proteína de membrana conhecida como CAR (receptor de coxsackie e adenovirus), cuja parte extracelular compreende dois domínios de imunoglobulina e é um componente regulatório da junção intercelular das células epiteliais (CUSACK, 2005). Vários membros da espécie B utilizam outro receptor celular, o CD46,

mas o receptor para o sorotipo 3 ainda não é conhecido (FUSCHIOTTI *et al.*, 2006). Após sua ligação inicial ao receptor, o vírus é internalizado por endocitose, a membrana da vesícula endossomal sofre ruptura por ação da base pênton e o DNA viral é injetado no núcleo celular (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). RNAm precoces são produzidos e transportados até o citoplasma para a síntese das proteínas precoces codificadas por eles. Essas proteínas voltam ao núcleo para induzir a replicação do DNA viral, a partir do qual RNAm tardios são transcritos. Estes vão ao citoplasma para a síntese das proteínas estruturais do vírion, que voltam ao núcleo onde formam o capsídeo viral quase completo, deixando espaço apenas para a entrada do DNA viral, após o que a estrutura do capsídeo se completa (GINSBERG, 1999). Concluída a encapsidação do DNA, a clivagem de várias proteínas do capsídeo e da proteína terminal ligada ao DNA proporciona a maturação da partícula em um vírion infeccioso estável. O ciclo se completa com a liberação de novas partículas virais da célula infectada, com o auxílio de uma proteína viral (E3), que é sintetizada em estágios bem tardios da infecção e promove a lise celular (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

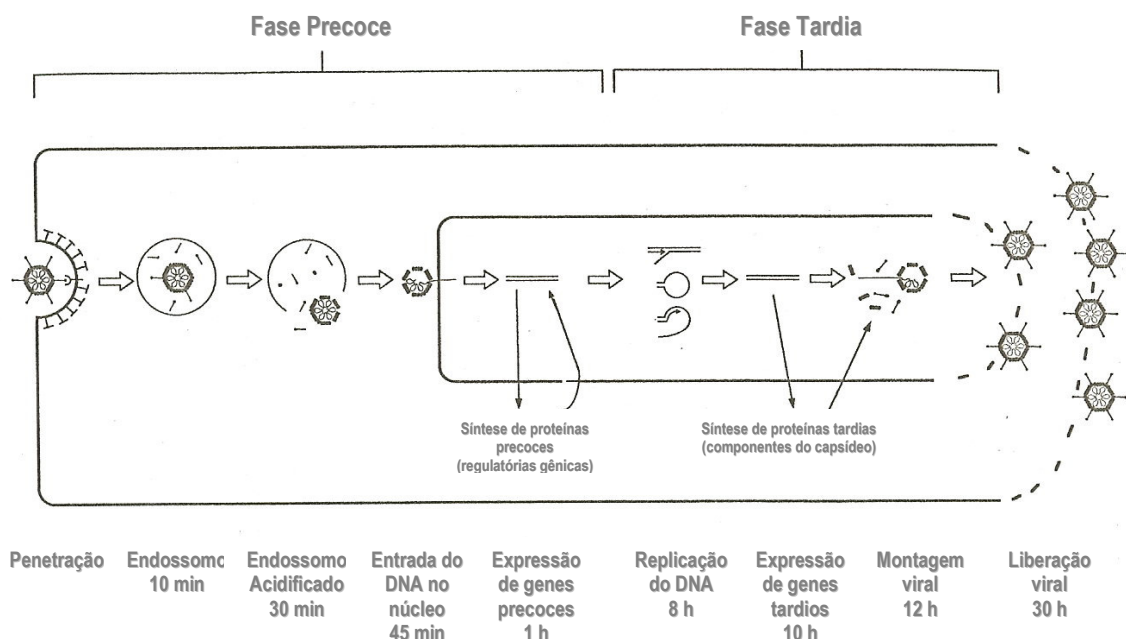


FIGURA 3 – Representação esquemática do ciclo de replicação do adenovírus. Fonte: Ruuskanen; Meurman; Akusjärvi, 1997 (adaptado).

1.3.5 Patogênese

O período de incubação da infecção por Ad dura em média 10 dias, variando entre dois e 15 dias. Os Ad se replicam nas células epiteliais dos tratos respiratório e gastrointestinal. Além disso, ocorre infecção persistente ou latente em linfócitos. Os achados histopatológicos nos pulmões se caracterizam geralmente por pneumonite intersticial difusa, necrose de células epiteliais brônquicas, bronquiolite com infiltrado de células mononucleares, necrose focal de glândulas mucosas e formação de membrana hialina. A microscopia óptica pode revelar pequenas inclusões eosinofílicas virais intranucleares ou grandes inclusões basofílicas. A inibição da síntese macromolecular leva à lesão e morte celular. Uma das proteínas estruturais do Ad, o pénton, é diretamente tóxico para as células. Doença grave em pacientes imunocomprometidos indica que o vírus é capaz de causar dano tecidual na ausência de resposta imune específica do hospedeiro. Entretanto, os mecanismos de defesa também podem desempenhar um papel importante na patogênese da infecção viral. Em modelos animais, a inoculação de Ad leva ao aparecimento de fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e IL-6. Em crianças com infecção fatal por Ad foram detectados TNF, IL-6 e IL-8 no soro, em contraste com pacientes com doença moderada, em que TNF e IL-6 não foram encontrados (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

1.3.6 Imunidade

O sistema de defesa competente do hospedeiro é a chave para a supressão da disseminação do Ad. Com relação às defesas inatas, sabe-se que algumas células epiteliais liberam peptídeos antimicrobianos chamados defensinas, e esses compostos podem proporcionar significativa proteção contra infecção por Ad. Alguns tecidos podem liberar múltiplas quimiocinas que, por sua vez, recrutam neutrófilos e evocam uma resposta inflamatória (RUSSELL, 2000). Por outro lado, algumas dessas moléculas podem repercutir na patogênese da infecção viral. Como já mencionado, podem ser encontrados TNF, IL-6 e IL-8 no soro de pacientes com doença grave (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Outros mecanismos de defesa inatos como recrutamento de macrófagos, ativação do sistema complemento e as células *natural killer* também desempenham um papel importante no combate a uma infecção por Ad (RUSSELL, 2000). Recentemente foi descoberto que alguns vírus respiratórios interagem com os receptores *Toll-like*, desencadeando mecanismos moleculares que medeiam o recrutamento de efetores da resposta imune adaptativa (CROWE; WILLIAMS, 2003). Com relação aos mecanismos adaptativos de defesa, as células T proporcionam uma defesa efetiva via células CD8⁺ citotóxicas e células auxiliares CD4⁺. As células citotóxicas funcionam pelo reconhecimento de antígenos virais em um complexo com

proteínas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. Parece haver alguma reatividade cruzada no reconhecimento de diferentes espécies de Ad por células citotóxicas humanas. As células auxiliares CD4⁺ são importantes ao montarem uma resposta proliferativa à infecção, que é mediada pelo reconhecimento de um antígeno viral associado a MHC de classe II. Essas células T auxiliares podem, assim, estimular a proliferação de células B, que vão produzir imunoglobulinas para a resposta humoral. Os anticorpos neutralizantes são dirigidos contra epítomos da fibra e da base pénton. Entretanto, há também antígenos no héxon que induzem anticorpos neutralizantes, e estes parecem funcionar agregando partículas virais e, assim, inibem a adsorção. A proteção pela imunidade humoral é restrita a cada um dos 51 sorotipos (RUSSELL, 2000). Por sua vez, os Ad possuem uma série de mecanismos que lhes permitem se evadirem das respostas imunes do hospedeiro. Estes incluem inibição da apoptose de células infectadas, inibição das respostas ao interferon e TNF, e prevenção de expressão de MHC de classe I na superfície celular (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003).

1.3.7 Epidemiologia

As infecções por Ad são transmitidas por contato direto, gotículas respiratórias aerossolizadas, por via fecal-oral, e algumas vezes pela água (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). A eficácia da disseminação tende a variar entre os sorotipos, e o contato íntimo parece ser essencial para a disseminação de uma pessoa a outra. Surtos têm ocorrido em piscinas, creches e escolas. Membros da família podem excretar Ad nas fezes por muitos meses após a infecção inicial, e a disseminação intradomiciliar parece continuar enquanto houver membros da família suscetíveis (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). As infecções por Ad ocorrem em todo o mundo de forma epidêmica, endêmica ou em casos esporádicos. Dos sorotipos que causam infecções respiratórias, os tipos 1, 2, 5 e 6 são principalmente endêmicos, enquanto os tipos 4, 7, 14 e 21 causam pequenas epidemias. O tipo 3 ocorre tanto endêmica como epidemicamente (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Os sorotipos que causam infecções oculares (8, 19 e 37) são frequentemente endêmicos em países em desenvolvimento com condições de higiene precária. Os sorotipos 40 e 41 ocorrem endemicamente em todo o mundo. Os sorotipos mais comuns em materiais clínicos são os tipos respiratórios da espécie C (sorotipos 1, 2 e 5) e espécie B (3 e 7), bem como os tipos entéricos 40 e 41. As infecções por Ad são mais comuns em crianças com idade entre seis meses e cinco anos, mas continuam a ocorrer por toda a vida. Pessoas com deficiência da imunidade celular apresentam risco aumentado de desenvolver infecções graves por Ad. Infecções disseminadas graves e ocasionalmente fatais

têm sido observadas em neonatos, em pacientes com imunodeficiência congênita e em pacientes transplantados (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

Os sorotipos 3, 7 e 21 têm sido associados com IVAIs mais graves em lactentes e a tipagem genômica de Ad com enzimas de restrição tem mostrado, recentemente, relação entre cepas virais e gravidade clínica. Também a duração da eliminação viral parece estar associada com a gravidade da infecção (LARRAÑAGA *et al.*, 2000).

Em geral, os casos de infecção por Ad são detectados em pequeno número ao longo do ano, podendo ocorrer pequenos surtos esporádicos (ARRUDA *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 2004; DALMÁS *et al.*, 2003; LARRAÑAGA *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2004; ROCHOLL *et al.*, 2004; SONODA *et al.*, 1999). Porém alguns estudos mostram um certo padrão de sazonalidade com a ocorrência de surtos nos meses de inverno e primavera (CARBALLAL *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2006; KIM; LEE; LEE, 2000).

A implementação de testes de neutralização para identificação do sorotipo de Ad, bem como o uso de enzimas de restrição para análise genômica, são restritos a poucos laboratórios de pesquisa. Alguns genotipos de Ad parecem representar um importante fator de risco para infecções graves e, por isso, esforços devem ser feitos para o desenvolvimento de métodos rápidos para análise de cepas, como por exemplo, PCR e diagnóstico imunológico usando anticorpos monoclonais (LARRAÑAGA *et al.*, 2000).

1.3.8 Manifestações Clínicas

1.3.8.1 Infecções de Vias Aéreas Superiores

Os Ad causam IVAS principalmente em crianças na faixa etária entre seis meses e cinco anos. A maioria destas infecções é leve e autolimitada e, em geral, as IVAS causadas por Ad são indistinguíveis daquelas causadas por outros vírus (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). A amigdalite é o achado mais característico destas infecções, freqüentemente acompanhada de exsudato. A febre elevada é outro achado comum. Também podem estar presentes adenomegalia cervical anterior, conjuntivite, exantema, hepatomegalia e esplenomegalia (DOMINGUEZ *et al.*, 2005). Os Ad podem ainda causar otite média aguda, laringite, convulsão febril e febre sem foco de infecção (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

A faringite acompanhada de conjuntivite, também chamada febre faringoconjuntival, foi reconhecida como entidade nosológica pouco depois da descoberta do Ad (BELL *et al.*, 1955) e desde então têm sido descritos surtos ocorrendo em escolas primárias ou relacionados com banhos de piscina (D'ANGELO *et al.*, 1979; GOMES *et al.*, 1988; HARLEY *et al.*, 2001; O'DONNELL *et al.*, 1986).

1.3.8.2 Infecções de Vias Aéreas Inferiores

Os Ad estão implicados em 4 a 10% dos casos de pneumonia, 2 a 10% dos casos de bronquiolite, e 3 a 9% dos casos de laringotraqueobronquite (HONG *et al.*, 2001). A pneumonia por Ad cursa com tosse, febre, dispnéia, alterações à ausculta pulmonar, incluindo crepitações, podendo aparecer achados radiológicos de condensação pulmonar, o que torna difícil a distinção de pneumonias de outras etiologias (FARNG *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 1998). A pneumonia por Ad pode estar associada à infecção disseminada envolvendo o coração, fígado, rins e sistema nervoso central. A taxa de mortalidade pode chegar a 30% (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). A febre alta persistente, os sinais pulmonares progressivos e a indisposição geral observados nas infecções por Ad mimetizam infecções bacterianas graves, levando ao tratamento sem sucesso com múltiplos antibióticos (LARRAÑAGA *et al.*, 2000). A bronquiolite causada por Ad apresenta manifestações clínicas que não podem ser distinguidas daquela causada por VSR, e a maioria ocorre em crianças com menos de dois anos de idade, enquanto a pneumonia acomete principalmente crianças com idade superior a essa (REINA *et al.*, 2004). Outras síndromes clínicas causadas por Ad são a bronquite e a “síndrome do bebê chiador” (CHEN *et al.*, 2004; LARRAÑAGA *et al.*, 2000).

1.3.8.2.1 Seqüelas de infecções por Ad

O papel dos Ad no desenvolvimento de doenças pulmonares crônicas incluindo bronquiolite obliterante em crianças está bem documentado (KIM *et al.*, 2001). Outras seqüelas, como bronquiectasias, síndrome de hiperlucência pulmonar unilateral, pulmão persistentemente colapsado, e resultados anormais de testes de função pulmonar podem se manifestar anos após a infecção por Ad. Cerca de 14% a 60% das crianças com IVAI por Ad documentada permanecem com algum grau de seqüela pulmonar (HONG *et al.*, 2001).

A bronquiolite obliterante é uma forma grave e pouco comum de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em crianças e adultos que resulta de uma agressão ao trato respiratório inferior (KIM *et al.*, 2001). Essa condição é caracterizada patologicamente por proliferação de fibroblastos, acentuada síntese de colágeno e surgimento de tecido cicatricial fibroso ou polipóide que oblitera o espaço bronquiolar (TEPER *et al.*, 1999). Os sintomas típicos de bronquiolite obliterante incluem tosse, chiado, taquipnéia, intolerância a exercícios e doenças respiratórias freqüentes (KIM *et al.*, 2001). Alguns fatores podem estar relacionados com a predisposição de certos pacientes a essa condição, como maior patogenicidade de determinados genótipos, particularmente o tipo 7h, suscetibilidade genética potencial do hospedeiro, ou fatores ambientais (TEPER *et al.*, 1999). Além disso, é possível

que respostas imunológicas e inflamatórias anormais ou excessivas do hospedeiro possam ser importantes no desenvolvimento dessa doença após infecções por Ad, pois os pacientes com pneumonia grave por Ad tem imunocomplexos circulantes contendo antígenos de Ad que podem ser encontrados depositados nos pulmões e rins, bem como níveis séricos aumentados de IL-6, IL-8 e TNF- α (MURTAGH; KAJON, 1997).

Estudos epidemiológicos identificaram infecções na infância como fatores de risco para o desenvolvimento subsequente de asma e DPOC. Infecções virais do trato respiratório ocorrendo naturalmente ou induzidas experimentalmente são seguidas pelo desenvolvimento de obstrução leve de vias aéreas e hiperreatividade brônquica em crianças, adultos e animais, o que levou à hipótese de que infecções respiratórias virais eram fatores etiológicos importantes na patogênese de asma e DPOC. A resposta imune do tipo Th2 a um episódio agudo de bronquite e/ou bronquiolite viral inicia uma produção exagerada de IL-4, IL-5 e outras citocinas que induzem um processo inflamatório em que há produção aumentada de IgE e atração de eosinófilos (HOGG, 1999).

1.3.8.3 Outras Síndromes Clínicas

1.3.8.3.1 Infecção em Recém-nascidos

Os recém-nascidos são susceptíveis a uma forma disseminada de infecção por Ad que é freqüentemente fatal. A infecção começa dentro de 10 dias de vida, com letargia, febre ou hipotermia, anorexia, apnéia, hepatomegalia, sangramento e pneumonia. Os sorotipos 3, 7, 21 e 30 têm sido isolados do pulmão e fígado (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

1.3.8.3.2 Gastreenterite

Os Ad podem ser encontrados nas fezes em 4% a 15% das crianças com gastreenterite, e representam a segunda causa mais comum de diarreia em crianças, sendo superados apenas pelos rotavírus. Dos Ad detectados nas fezes, os sorotipos 40 e 41 compreendem de 30% a 80%. Os outros sorotipos encontrados nas fezes são 1, 2, 3, 5, 7 e 31. A diarreia por Ad é mais comum em crianças menores de dois anos de idade. Por volta dos três anos de idade, 30% a 100% das crianças têm anticorpos neutralizantes contra os sorotipos 40 e 41. Nenhum achado clínico em especial diferencia a diarreia por Ad daquela induzida por outros vírus, exceto pela duração média da diarreia que é de três a 11 dias, sendo significativamente maior que a diarreia por rotavírus. As fezes são geralmente aquosas e não sanguinolentas. Febre e vômitos são comuns (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

1.3.8.3.3 Infecção em Pacientes Imunocomprometidos

As infecções por Ad em pacientes imunocomprometidos são freqüentemente diferentes daquelas em hospedeiros normais em termos de persistência e gravidade da doença e da associação com sorotipos diferentes de Ad. As manifestações clínicas da infecção por Ad em receptores de transplante de medula óssea (TMO) incluem febre alta, pneumonia, cistite hemorrágica, encefalite, hepatite, nefrite e colite. Os sorotipos de Ad isolados desses pacientes pertencem, geralmente, à espécie B (sorotipos 11, 34 e 35) (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Infecção disseminada por Ad em crianças e adultos com AIDS ou câncer e em receptores de TMO ou órgãos sólidos é descrita com freqüência cada vez maior. Na maioria dos relatos, os pacientes pediátricos são mais acometidos que os adultos. Infecção disseminada também tem sido descrita em recém-nascidos e em crianças imunocompetentes em associação com infecções virais que induzem supressão temporária da imunidade celular. Infecção disseminada raramente ocorre em crianças imunocompetentes previamente saudáveis (MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998). A incidência geral de infecções por Ad em pacientes adultos e pediátricos submetidos a TMO em um grande estudo americano foi de 21% (FLOMENBERG *et al.*, 1994). Em pacientes submetidos a transplante hepático a freqüência de culturas positivas para Ad varia entre 8% e 18% e entre os receptores de transplante renal gira em torno de 12%. Também entre os pacientes com AIDS a incidência é elevada, com risco atuarial em um ano de 28% (CARRIGAN, 1997).

1.3.8.3.4 Infecção em Recrutas Militares

Os Ad são notórios como causa de surtos de infecções de vias aéreas superiores e inferiores em recrutas militares, provavelmente devido à aglomeração e ao estresse (COLLIER, 2000). É causada principalmente pelos sorotipos 4 e 7, e acomete recrutas recém-chegados para treinamento. A doença não ocorre em soldados já estabelecidos e não é disseminada para indivíduos da população em geral que mantêm contato com os recrutas, sugerindo que fatores adicionais, como a fadiga associada ao treinamento militar, contribuem para a infecção (RÁCZ, 2004). Os sintomas incluem febre, congestão nasal, dor de garganta, tosse e rouquidão, e freqüentemente estão associados com faringoamigdalite, bronquite e pneumonia (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

1.3.8.3.5 Ceratoconjuntivite Epidêmica

Numerosos surtos de ceratoconjuntivite por Ad têm sido descritos, e geralmente ocorrem em fábricas, clínicas oftalmológicas, acampamentos, bases militares e creches (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). São causados, geralmente, por

membros da espécie D, particularmente pelos sorotipos 8, 19 e 37 (PERCIVALLE *et al.*, 2003). Os sinais clínicos incluem lacrimejamento, edema palpebral, formação de pseudomembrana e hemorragia palpebral, e ceratite epitelial puntiforme ou geográfica (RAJAIYA; CHODOSH, 2006).

1.3.9 Diagnóstico Laboratorial

1.3.9.1 Isolamento Viral

Os Ad podem ser isolados de secreções respiratórias, fezes, secreção conjuntival, urina, e de uma variedade de sítios infectados (RAY; MINNICH, 1991). As amostras devem ser coletadas, preferencialmente, nos primeiros sete dias do surgimento dos sintomas. Após esse tempo a excreção do vírus e a sensibilidade do isolamento diminuem. Amostras coletadas em *swabs* e espécimes de biópsia devem ser conduzidos ao laboratório em meio de transporte. Fezes e líquido podem ser transportados em recipientes estéreis. Os Ad são relativamente estáveis. O transporte da amostra em gelo (4°C) ou congelada é preferível para manter a máxima sensibilidade, mas a maioria dos Ad podem ser isolados a partir de amostras transportadas à temperatura ambiente. Todos os sorotipos de Ad humanos, exceto o 40 e o 41, crescem bem e produzem efeito citopático (ECP) em uma variedade de células epiteliais humanas (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Embora as culturas celulares primárias de rim embrionário humano sejam bastante sensíveis para o isolamento de Ad, geralmente são utilizadas linhagens celulares contínuas, que incluem células HeLa (derivadas de carcinoma cervical) e células HEP-2 (derivadas de carcinoma de laringe), bem como linhagens celulares diplóides, que incluem células MRC-5 (fibroblastos pulmonares embrionários humanos) (RAY; MINNICH, 1991). O isolamento viral continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de Ad e, na maioria dos casos, exceto para gastroenterite, o método disponível com maior sensibilidade. O isolamento a partir de amostras de infecções respiratórias tem sensibilidade de 85% a 100% (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997).

1.3.9.2 Detecção de Antígenos

Anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra antígeno grupo-específico do héxon podem ser usados para a detecção direta de todos Ad em amostras clínicas. Em amostras respiratórias e oculares, as células infectadas podem ser detectadas por imunofluorescência, enquanto os imunoenaios (imunoensaio enzimático, fluoroimunoensaio) podem ser usados para detectar tanto proteínas antigênicas livres quanto ligadas a células. Os aspirados de nasofaringe são as amostras ideais. Maior sensibilidade é obtida se a amostra for

coletada durante os primeiros 4 ou 5 dias após o início dos sintomas, mas alguns pacientes permanecem positivos por 2 a 3 semanas. A sensibilidade dos imunoenaios é de 75% a 90% em crianças, mas consideravelmente menor em adultos (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). A imunofluorescência tem sensibilidade menor que os imunoenaios, ficando em torno de 69 a 73% (MINNICH; RAY, 1980; MOURA *et al.*, 2002).

1.3.9.3 Detecção de Ácidos Nucléicos

DNA de Ad pode ser detectado diretamente de amostras respiratórias ou de fezes usando hibridização de ácidos nucleicos ou PCR (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). O método de PCR, além de ter sensibilidade superior à da imunofluorescência no diagnóstico de IRAs virais, apresenta outras vantagens como o fato de ser menos afetado pela qualidade e transporte da amostra e proporcionar uma interpretação objetiva dos resultados. A tecnologia de PCR em tempo real, que combina a amplificação de ácidos nucleicos com a detecção do amplicon, proporciona resultados mais rápidos e mostra, em alguns casos, sensibilidade superior comparada ao PCR convencional, além de proporcionar uma plataforma uniforme para a quantificação de um ou múltiplos patógenos em uma mesma amostra (KUYPERS *et al.*, 2006). Entretanto, devido à sensibilidade muito elevada das técnicas de PCR, torna-se difícil distinguir entre o material genético residual de infecções prévias e os vírus que estão em replicação numa atual infecção. Assim, a interpretação dos resultados dos métodos de detecção de ácidos nucleicos, quando usados isoladamente, deve ser bastante criteriosa (LARCHER *et al.*, 2006). As diferentes variações da técnica de PCR, como o ensaio de PCR multiplex, o seqüenciamento dos produtos de amplificação por PCR, ou a realização de restrição enzimática sobre os amplicons, podem ser utilizadas inclusive para a classificação de Ad em espécies ou até em sorotipos (ELNIFRO *et al.*, 2000; SARANTIS *et al.*, 2004; XU; MCDONOUGH; ERDMAN, 2000).

1.3.10 Tratamento e Prevenção

O tratamento das IRAs por Ad consta basicamente de medidas de suporte e, nos casos de IVAIs, incluem oxigenioterapia, uso de broncodilatadores e terapia com corticosteróides. Nos casos mais graves pode haver necessidade de ventilação mecânica (CHUANG *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2001; REINA *et al.*, 2004; ROCHOLL *et al.*, 2004; STRALIOTTO *et al.*, 2004). Até o momento não existe tratamento específico para a infecção por Ad, mas drogas antivirais tais como ganciclovir e ribavirina já foram usadas, geralmente em associação com imunoglobulina intravenosa, com resultados variáveis dependendo da gravidade da infecção (MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998). Outra droga que já foi

utilizada é o cidofovir, porém de forma limitada devido aos seus efeitos adversos, sobretudo a nefrotoxicidade (GAVIN; KATZ, 2002). Um estudo *in vitro* avaliando a sensibilidade de cepas de Ad à ribavirina e ao cidofovir mostrou que a sensibilidade à ribavirina é altamente dependente da espécie. Os sorotipos pertencentes às espécies A, B, D, E e F foram todos resistentes à ribavirina (MORFIN *et al.*, 2005).

A simples lavagem das mãos com água e sabão pode não remover eficazmente os Ad. Também é sabido que o álcool isopropílico e a clorexidina não inativam os Ad. Assim, o uso de luvas descartáveis deve ser considerado ao se examinar um paciente com suspeita de infecção por Ad (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Foram utilizadas vacinas vivas orais para prevenir infecções pelos Ad nos recrutas militares americanos durante 25 anos, mas embora altamente eficazes, tiveram sua produção suspensa em 1996 devido aos elevados custos de produção (HOWELL *et al.*, 1998; RUSSELL *et al.*, 2006). Devido ao fato de não serem atenuadas e à apreensão quanto ao potencial oncogênico dos Ad, essas vacinas nunca foram liberadas para utilização na população civil e, portanto, não estavam disponíveis para uso em crianças (KAJON, 1995).

1.4. Justificativa do Estudo

Os Ad destacam-se em diversos estudos brasileiros e sul-americanos como o segundo agente mais freqüente de IRAs virais infantis que geram a necessidade de hospitalização. Muitas IRAs causadas por Ad evoluem com o desenvolvimento de seqüelas ou mesmo para o óbito. Por meio deste estudo pretende-se obter informações epidemiológicas e clínicas sobre as infecções respiratórias agudas infantis causadas pelo adenovírus em nossa região, preenchendo dessa forma parte da lacuna existente sobre viroses respiratórias na região Nordeste do Brasil. A consistência dos dados a serem apresentados neste estudo se baseia no número de crianças que compõe a população de estudo e na coleção de dados acumulados em seis anos consecutivos.

1.5. Pergunta de partida

Quais são as características clínico-epidemiológicas das IRAs causadas por Ad nas crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e qual a importância e a freqüência de detecção do Ad em casos de IRAs infantis?

1.6. Hipóteses

As IRAs causadas por Ad em crianças atendidas em hospital de referência na cidade de Fortaleza apresentam manifestações clínicas semelhantes às de outras cidades brasileiras e de outros países;

As características epidemiológicas dessas infecções são similares às observadas em outros estudos nacionais e internacionais sobre IRAS por Ad em pacientes pediátricos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estabelecer o perfil epidemiológico e clínico das infecções respiratórias agudas causadas por Ad em crianças atendidas no HIAS, na cidade de Fortaleza, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

2.2 Objetivos Específicos

- Observar a frequência de identificação de Ad como agente de IRAs em crianças que compõem a população de estudo;
- Descrever a distribuição mensal das IRAs por Ad nos diversos anos de estudo para averiguar se existe uma sazonalidade das IRAs por esses agentes na cidade de Fortaleza;
- Descrever as principais características clínicas das infecções respiratórias causadas por Ad;
- Determinar a taxa de isolamento de Ad a partir da inoculação em cultura de células HEp-2 de amostras de secreções de nasofaringe consideradas positivas para Ad por imunofluorescência indireta (IFI);
- Criar um banco de cepas de Ad para futuros estudos sobre diversidade antigênica e genômica desses agentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do Estudo

3.1.1 Local do Estudo

O estudo foi realizado na cidade de Fortaleza, capital do estado do Ceará. A cidade de Fortaleza apresenta clima tropical, com umidade relativa do ar média de 77% e temperatura média anual de 27°C, e possui uma população de 2.141.402 habitantes, em uma área de 313,14 Km² segundo dados do censo populacional de 2000, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Os pacientes do estudo foram selecionados no HIAS, que é um hospital público de ensino, especializado em pediatria, localizado na cidade de Fortaleza. Possui 252 leitos distribuídos em seis blocos de enfermarias e quatro UTIs. Conta ainda com serviço de emergência e atendimento ambulatorial especializado. Realiza em média 600 internações mensais e cerca de 7700 atendimentos ambulatoriais e 4800 atendimentos de emergência por mês.

3.1.2 Tipo de Estudo

Este é um estudo do tipo observacional, retrospectivo, descritivo, transversal, realizado por um período de 72 meses, de janeiro de 2001 a dezembro de 2006. É um estudo que utilizou amostragem de conveniência em um hospital terciário. Faz parte de uma linha de pesquisa permanente do Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará sobre infecções respiratórias virais em pacientes pediátricos, que teve início em 2001.

3.1.3 População Estudada

A população de estudo foi composta de crianças apresentando sintomas ou sinais de IRA atendidas em ambulatórios, emergência e enfermarias do HIAS no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006. A seleção dos pacientes foi baseada nos seguintes critérios de inclusão:

- ✓ Quadro clínico compatível com infecção de vias aéreas superiores e/ou inferiores;
- ✓ Início da apresentação da IRA há no máximo sete dias;
- ✓ Presença de secreção nasofaríngea;
- ✓ Obtenção de consentimento escrito do responsável pela criança (Anexo I).

3.1.4 Critérios de Definição de IRAs

De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 1993) a presença de um ou mais dos seguintes sinais caracteriza um caso de IRA: tosse, dificuldade para respirar, chiado, coriza, dor de ouvido, dor de garganta, com evolução média de sete dias. A classificação destas infecções em IVAS ou IVAI obedece ao padrão anatômico das vias aéreas, tendo como limite a epiglote. Assim, são classificadas como IVAS todas as síndromes clínicas com localização acima da epiglote, e como IVAI aquelas com localização abaixo da epiglote. As síndromes clínicas que constituem o grupo das IVAS são amigdalite, otite média aguda, sinusite e rinofaringite aguda (resfriado comum). Dentre as IVAI temos laringotraqueobronquite, laringite diftérica, epigloteite, pneumonia e bronquiolite (Brasil, 1993).

3.2 Coleta de Dados

3.2.1 Coleta das Amostras

As amostras de secreção de nasofaringe (SNF) vêm sendo coletadas desde o ano de 2001 por integrantes da equipe do Laboratório de Virologia do DPML.

A SNF foi obtida por aspiração utilizando sonda uretral nº 6 ou 8 (de acordo com a idade do paciente) conectada a uma seringa descartável de 20 mL (Figura 4), conforme descrito por Moura e cols. (2003). A sonda era introduzida em uma das narinas até a altura da nasofaringe (aproximadamente metade da distância compreendida entre o nariz e o ouvido da criança). Caso não fosse coletado material suficiente, esse procedimento era repetido na outra narina. Cerca de 1 a 2 mL de SNF foi obtido de cada paciente. Após a coleta a seringa era identificada com o nome da criança e acondicionada em caixa de isopor contendo gelo reciclável. No prazo máximo de quatro horas a amostra era transportada ao Laboratório de Virologia do DPML, onde permanecia sob refrigeração a 4°C até seu processamento.



FIGURA 4 – Demonstração da técnica de coleta de secreção de nasofaringe. Fonte: acervo pessoal.

3.2.2 Entrevista e Preenchimento da Ficha Epidemiológica

O responsável pela criança era informado sobre os objetivos do trabalho e os procedimentos necessários para a realização da coleta. Caso concordasse com a realização da coleta da amostra clínica para exame laboratorial, tinha acesso ao termo de consentimento livre e esclarecido, que devia ser assinado, para que a criança então participasse da população de estudo (Anexo I). O responsável pela criança era entrevistado para preenchimento da ficha epidemiológica (Anexo II). Alguns dados, como exame físico, aspectos clínicos, exames realizados e tratamento instituído, foram obtidos do médico responsável pelo atendimento ou ainda através da revisão dos prontuários dos pacientes internados ou da folha de prescrição e atendimento dos pacientes encaminhados para observação.

3.2.3 Dados de Pluviometria

A média mensal do índice pluviométrico na cidade de Fortaleza em todo o período do estudo foi obtida da Fundação Cearense de Meteorologia (FUNCEME).

3.2.4 Questões Éticas

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HIAS em 14 de fevereiro de 2006 (ofício nº 13/06) (anexo III).

3.3 Processamento das Amostras

No máximo quatro horas após a coleta, a SNF era colocada em um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 2 mL de Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (MEM-E), adicionado de penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina), L-glutamina a 2% e bicarbonato de sódio a 7,5%. A seguir a amostra era homogeneizada por meio de movimentos de aspiração e ejeção para facilitar a quebra do muco e permitir a liberação das células presentes na secreção. Para isso era utilizada pipeta Pasteur acoplada a uma pêra de borracha. Alíquotas de aproximadamente 600 µL eram distribuídas em dois criotubos e armazenadas em *freezer* para análise posterior, inclusive isolamento viral em cultura de células. O conteúdo restante da SNF era centrifugado a 1500 rpm (400 x g) por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante era armazenado em *freezer* para isolamento viral e estudos posteriores. O sedimento era diluído em tampão salina fosfato (PBS) e distribuído em três lâminas de imunofluorescência, sendo uma para triagem de casos positivos e negativos, outra para identificação do vírus em casos considerados positivos pela triagem, e uma de reserva. Após secagem da secreção nas lâminas em estufa a 37°C as mesmas eram fixadas em acetona a 4°C por 10 minutos. Após evaporação da acetona, as lâminas de triagem eram submetidas à reação de IFI. As lâminas destinadas a IFI específica e as lâminas de reserva eram estocadas em *freezer* até serem submetidas à reação de imunofluorescência.

Obs.: Até meados de 2005 as amostras e lâminas eram estocadas em *freezer* a -20°C e a partir de então passaram a ser estocadas em *freezer* a -70°C.

3.4 Métodos Diagnósticos Utilizados

3.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A IFI foi realizada através do emprego do “Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit” (Chemicon International Inc.) seguindo as instruções do fabricante. Esse kit é destinado à identificação qualitativa de VSR, Ad, Flu A e B e vírus parainfluenza 1, 2 e 3. Na lâmina de triagem, adicionava-se em um dos poços 13 µL de uma mistura de anticorpos monoclonais contra os vírus identificados pelo *kit*, e, em outro, 13 µL de anticorpo de camundongo normal, que servia como controle negativo da reação. As lâminas eram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e, a seguir, lavadas em PBS por cinco minutos e submetidas a secagem em estufa a 37°C. O segundo anticorpo (anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína) era, então, adicionado a cada orifício. As lâminas eram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e, em seguida, lavadas em PBS por cinco minutos em local protegido da luz. Após a secagem das lâminas

em estufa, era adicionado óleo de montagem e as lâminas eram recobertas com lamínulas e observadas em microscópio de imunofluorescência de marca Olympus modelo BX-41. As amostras positivas nessa etapa eram submetidas a um segundo procedimento de IFI, que seguia a mesma metodologia da triagem, exceto pelo fato de que o primeiro anticorpo a ser utilizado agora era o anticorpo específico para cada um dos sete vírus. Foi considerado como resultado positivo para adenovírus a presença de inclusões fluorescentes características no citoplasma ou núcleo de células do aparelho respiratório (Figura 5).

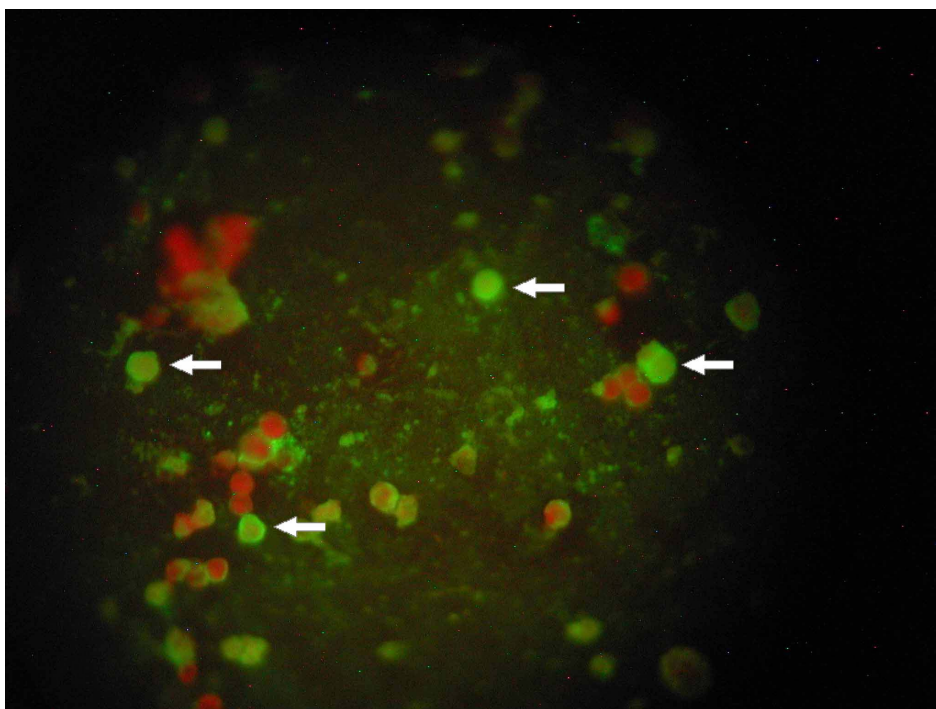


FIGURA 5 – Visualização de amostra positiva para adenovírus à microscopia de imunofluorescência. As células positivas apresentam fluorescência citoplasmática e/ou nuclear (setas) e as células negativas apresentam-se coradas em vermelho. Fonte: acervo pessoal.

3.4.2 Isolamento Viral

Cerca de 200 μ L das amostras colocadas em criotubos e armazenadas em *freezer* eram inoculadas em tubos contendo monocamadas de células HEp-2 (células derivadas de carcinoma laríngeo humano). A linhagem celular foi cedida pelo Laboratório de Vírus Respiratórios da FIOCRUZ – RJ. Para o crescimento celular era utilizado o meio de cultura MEM-E (GIBCO-BRL) suplementado com penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 μ g/mL), L-glutamina a 2% e bicarbonato de sódio a 7,5% para atingir um pH entre 7,0 e 7,2. Ao MEM-E era adicionado soro bovino fetal (SBF) a 10%. O SBF antes de ser adicionado ao MEM-E era inativado a 56°C por 30 minutos. Enquanto a monocamada não estava completa,

a troca do meio de cultura era realizada diariamente. Quando a monocamada estava completa, a mesma era tripsinizada para realização de novas passagens dessas células em frascos semelhantes ou para preparação de tubos. Algumas passagens celulares foram congeladas em nitrogênio líquido para manter o estoque de células do laboratório. Para a inoculação das amostras eram preparadas monocamadas de células HEp-2 em tubos de isolamento viral. A inoculação das amostras era feita quando as células apresentavam em torno de 80% de confluência. Após a inoculação, o tubo era colocado em estufa a 37°C por 30 minutos para facilitar a adsorção viral. Após essa etapa, colocava-se 1 ml de MEM-E a 2% de SBF no tubo que era incubado em estufa a 37°C. A observação dos tubos era feita diariamente para detecção de formação de ECP que consiste de arredondamento das células com agrupamento das mesmas em forma de cachos de uva. A troca do meio de cultura era realizada em dias alternados. A monocamada que não apresentasse ECP dentro de sete dias era raspada e reinoculada em novo tubo. A observação dos tubos era feita por até 21 dias. Tubos que apresentassem contaminação por bactérias ou fungos eram descartados, a amostra era submetida a filtração e nova inoculação era realizada. Tubos que apresentassem descolamento espontâneo da monocamada eram descartados e nova inoculação da amostra era realizada posteriormente. Amostras que não apresentassem ECP dentro dos 21 dias eram consideradas negativas. Quando o ECP se manifestava em 70% da monocamada a mesma era raspada. As células raspadas em meio de cultura eram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante era armazenado em *freezer* para inoculações futuras. O sedimento de células era utilizado para preparação de lâminas para IFI para detecção de antígenos do Ad. Esta técnica para isolamento de Ad segue o modelo apresentado por Moura (2001).

3.5 Análise Estatística dos Dados

Foram aplicados estudos comparativos entre o grupo de pacientes positivos para adenovírus, os grupos de pacientes positivos para os vírus mais frequentemente detectados (VSR e Flu A) e o grupo de pacientes negativos para os vírus pesquisados. Na comparação entre as variáveis categóricas, foram utilizados o teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado de Pearson. Na comparação de médias, foi utilizado o teste t-Student. Para a verificação de correlação entre variáveis quantitativas, foram utilizados os coeficientes de correlação de Spearman e de Pearson. Para cada teste, é apresentado o p-valor correspondente. Foram considerados significativos valores de p menores que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição Anual e Mensal das IRAs no Período de Estudo

Durante o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 um total de 3070 pacientes pediátricos com diagnóstico de IRA foi incluído no estudo. A frequência anual de casos variou entre os diversos anos do estudo. O menor número de casos ocorreu em 2004, com 396 pacientes e o maior número em 2006, com 634 pacientes. A média de casos de IRA no período estudado foi de 511,7 casos/ano. A distribuição anual de casos de pacientes com IRA incluídos no estudo é demonstrada na tabela 1.

TABELA 1 – Distribuição anual dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Ano	Nº de casos	Percentual
2001	559	18,21
2002	467	15,21
2003	530	17,26
2004	396	12,90
2005	484	15,76
2006	634	20,65
Total	3070	100

Com relação à distribuição mensal acumulada de casos de IRAs o período em que ocorreram as maiores frequências foi durante os meses de março a julho. Os meses com os menores números de casos foram novembro e dezembro (Tabela 2).

TABELA 2 – Distribuição mensal acumulada dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Mês	Nº de casos	Percentual
Jan	183	5,96
Fev	166	5,41
Mar	357	11,63
Abr	474	15,44
Mai	432	14,07
Jun	325	10,59
Jul	332	10,81
Ago	146	4,76
Set	229	7,46
Out	214	6,97
Nov	112	3,65
Dez	100	3,26
Total	3070	100

4.2 Caracterização Demográfica da População de Estudo

As características gerais da população de estudo são apresentadas na tabela 3. Com relação ao sexo dos pacientes, foi observada uma predominância de crianças do sexo masculino, com 54,85% dos casos. A proporção masculino/feminino foi de 1,2:1. Quanto à idade das crianças incluídas nesse estudo, cerca de 48% dos pacientes tinham até um ano de idade. A frequência de IRA continuou elevada até os dois anos de idade, com cerca de 75% dos pacientes pertencendo a essa faixa etária, quando, então, começou a declinar a níveis significativos (Figura 6). Crianças com idade superior a cinco anos representaram 5,96% do total. A análise da idade e sexo da população de estudo mostrou que a média de idade dos pacientes do sexo masculino foi de 21 meses e de 24 meses para aqueles do sexo feminino.

Quanto ao setor de atendimento dos pacientes, das 3070 crianças incluídas no estudo 1804 (58,76%) foram atendidas na emergência e 893 (29,09%) no ambulatório. Um total de 369 pacientes (12,02%) teve suas amostras coletadas nas enfermarias. Deve-se ressaltar que o atendimento ambulatorial geral no HIAS foi suspenso a partir de outubro de 2003, permanecendo apenas os ambulatórios de especialidades.

TABELA 3 – Características demográficas dos pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Característica	Nº de pacientes	Percentual
Sexo		
Masculino	1684	54,85
Feminino	1382	45,02
Não informado	04	0,13
Idade (meses)		
0-6	692	22,54
7-12	777	25,31
13-18	415	13,52
19-24	426	13,87
25-60	570	18,57
>60	183	5,96
Não informada	07	0,23
Setor de atendimento		
Ambulatório	893	29,09
Emergência	1804	58,76
Enfermarias/UTI	369	12,02
Não informado	04	0,13

UTI – Unidade de terapia intensiva

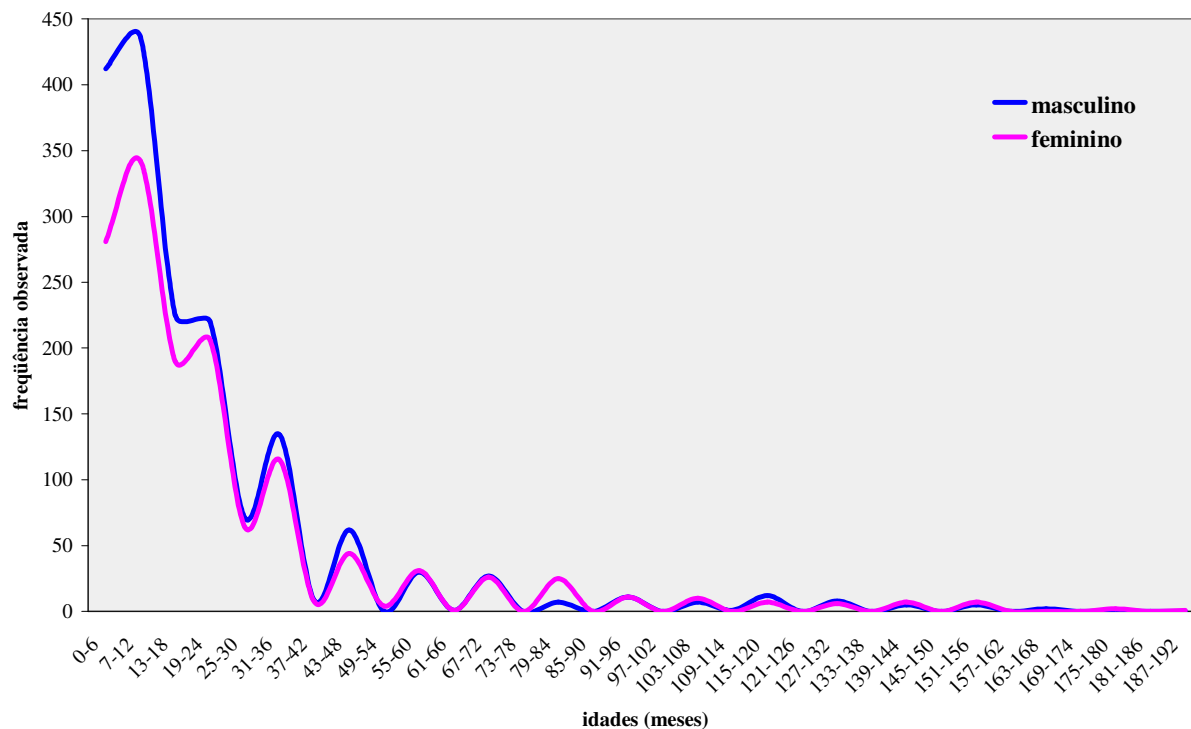


FIGURA 6 – Distribuição por idade e sexo dos pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

A maioria das crianças do estudo foi amamentada (86,9%), mas apenas 43,3% delas foram amamentadas por seis meses ou mais. Cerca de 33% das crianças mamaram por menos de seis meses e em torno de 12% não mamaram.

Com relação ao estado vacinal das crianças do estudo, cerca de 91% delas estavam com a vacinação em dia.

Um reduzido percentual de pacientes freqüentava creche ou escola (18,7%).

Cerca de 57% da população de estudo pertencia a famílias com renda mensal de até um salário mínimo. Famílias com rendimento maior que um salário e até dois salários mínimos ocupavam a segunda colocação, representando 27,8%. Apenas 10,5% das famílias tinham renda mensal superior a dois salários mínimos.

4.3 Frequência das IRAs Virais

A freqüência de IRAs virais na população de estudo foi de 30,39% (933/3070). Dentre os vírus pesquisados, o Ad ocupou a quarta posição em freqüência de identificação, sendo responsável por 1,86% das IRAs e 6,1% das IRAs virais. A tabela 4 apresenta o número de casos de IRAs, o número de casos de infecções respiratórias causadas pelos vírus pesquisados, bem como aquelas causadas pelo Ad especificamente a cada ano do estudo.

TABELA 4 – Distribuição anual dos casos de infecções respiratórias agudas, infecções respiratórias virais e infecções respiratórias por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Ano	Casos de IRA	Casos de IRA virais	Casos de IRA por Ad
2001	559	210	17
2002	467	152	10
2003	530	130	11
2004	396	151	5
2005	484	168	6
2006	634	122	8
Total	3070	933	57

Ad – Adenovírus; IRA – Infecção respiratória aguda

4.4 Diagnóstico Laboratorial das IRAs Virais

Todas as 3070 amostras coletadas foram submetidas a IFI. Quarenta e uma amostras positivas para Ad por IFI estavam disponíveis para inoculação em cultura de células HEp-2. Outras 103 amostras negativas por IFI para todos os vírus pesquisados foram escolhidas aleatoriamente para também ser inoculadas em cultura de células.

4.4.1 Imunofluorescência Indireta

Das 3070 amostras submetidas a IFI 930 foram positivas para pelo menos um vírus. Dessas, 34 (3,65%) apresentavam mais de um vírus simultaneamente. Casos de co-infecções foram observados em todos os anos do estudo, exceto no ano de 2005. A co-infecção mais comum foi entre vírus sincicial respiratório e influenza A, com 17 casos. O adenovírus foi detectado em 11 casos de co-infecção, sendo a associação mais frequente com o influenza A, observada em cinco casos. A tabela 5 apresenta a distribuição de resultados por tipo de vírus.

TABELA 5 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 segundo o resultado da imunofluorescência.

Imunofluorescência	Nº de casos	Percentual
Negativa	2140	69,71
VSR	548	17,85
Flu A	172	5,60
Parainfluenza 3	98	3,19
Ad	43	1,40
VSR + Flu A	17	0,55
Flu B	16	0,52
Parainfluenza 1	14	0,46
Parainfluenza 2	5	0,16
Ad + influenza A	5	0,16
VSR + Ad	3	0,10
VSR + Ad + Flu A	2	0,07
VSR + parainfluenza 1	2	0,07
Flu A + Flu B	1	0,03
Parainfluenza 1 + parainfluenza 2	1	0,03
Parainfluenza 2 + parainfluenza 3	1	0,03
VSR + Flu A + Parainfluenza 1	1	0,03
Ad + Flu A + parainfluenza 3	1	0,03
Total	3070	100

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; Flu B – Vírus influenza B; VSR – Vírus sincicial respiratório

4.4.2 Isolamento Viral

De 54 amostras positivas para Ad por IFI, 41 (75,93%) foram inoculadas em monocamadas de células HEp-2, sendo que em 32 (78,05%) houve isolamento viral. Além destas, também outras 103 amostras negativas foram inoculadas, sendo 19 do ano 2001, 22 de 2002, 10 de 2003, 38 de 2004, e 14 de 2006. Destas 103 amostras, três se mostraram positivas na cultura, resultando num total de 57 casos confirmados de IRA por Ad. A tabela 6 mostra a distribuição anual de amostras positivas por IFI inoculadas, com os percentuais de positividade.

TABELA 6 – Isolamento de adenovírus em pacientes com infecções respiratórias agudas atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 a partir de amostras positivas por imunofluorescência indireta de acordo com o ano de coleta.

Ano de coleta	Nº de amostras positivas para adenovírus por IFI	Quantidade de amostras inoculadas	Isolamento viral
2001	17	12	10 (83,33%)
2002	10	4	4 (100%)
2003	9	7	3 (42,86%)
2004	5	5	5 (100%)
2005	6	6	5 (83,33%)
2006	7	7	5 (71,43%)
Total	54	41	32 (78,05%)

4.5 Características Epidemiológicas das Infecções por Ad

4.5.1 Distribuição Mensal de Casos

As infecções respiratórias agudas por adenovírus ocorreram em número variável nos 12 meses do ano, em todo o período de estudo, sem que se observasse um padrão de sazonalidade. A figura 7 apresenta a distribuição mensal das IRAs por adenovírus nos diferentes anos de estudo. As IRAs por Ad foram identificadas em número pequeno nos diferentes anos, com o número máximo de 17 casos observados em 2001 e o mínimo de cinco em 2004. Também em 2001 se observou uma distribuição dessas infecções em um maior número de meses e, apenas nos meses de janeiro, maio, agosto e novembro não houve registro dessas infecções. Em 2004 e 2005 foram os anos em que as IRAs por Ad se distribuíram em um menor número de meses, no caso apenas quatro meses. O único mês em que se observaram IRAs por Ad nos diversos anos de estudo foi o mês de julho. Por sua vez, o mês de maio foi o único mês sem um único registro de caso dessas infecções nos diversos anos.

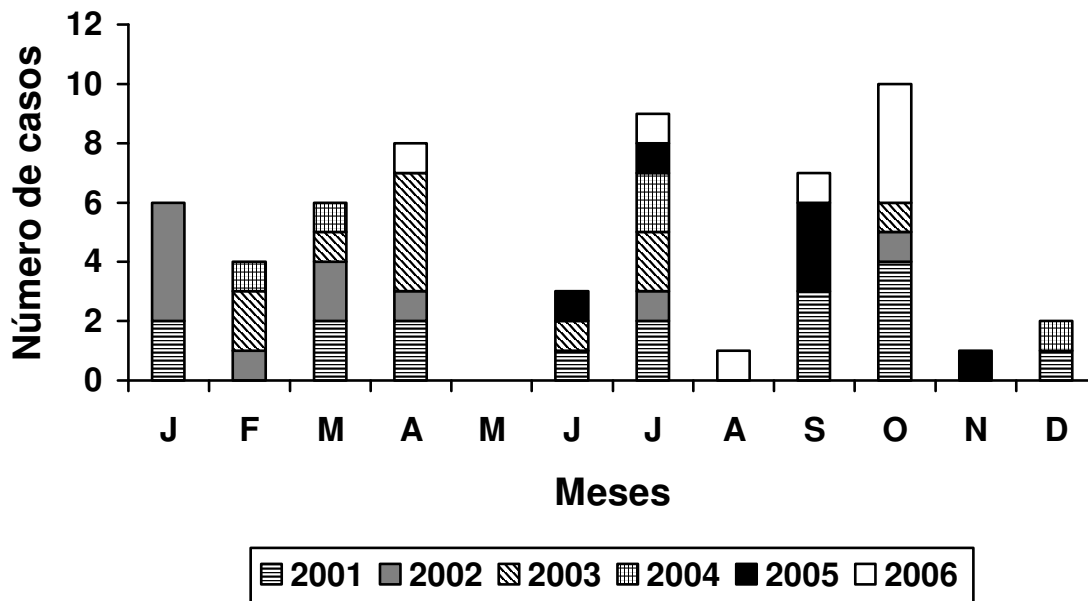


FIGURA 7 – Distribuição mensal dos casos de infecções respiratórias agudas por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

4.5.2 Relação entre Infecções por Ad e Índices Pluviométricos

Para testar a relação entre os índices pluviométricos na cidade de Fortaleza e o número de casos de IRAs, foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson, sendo verificada uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p= 0,0000$), ou seja, uma associação entre o período chuvoso e o aumento da frequência de casos de IRAs (Figura 8).

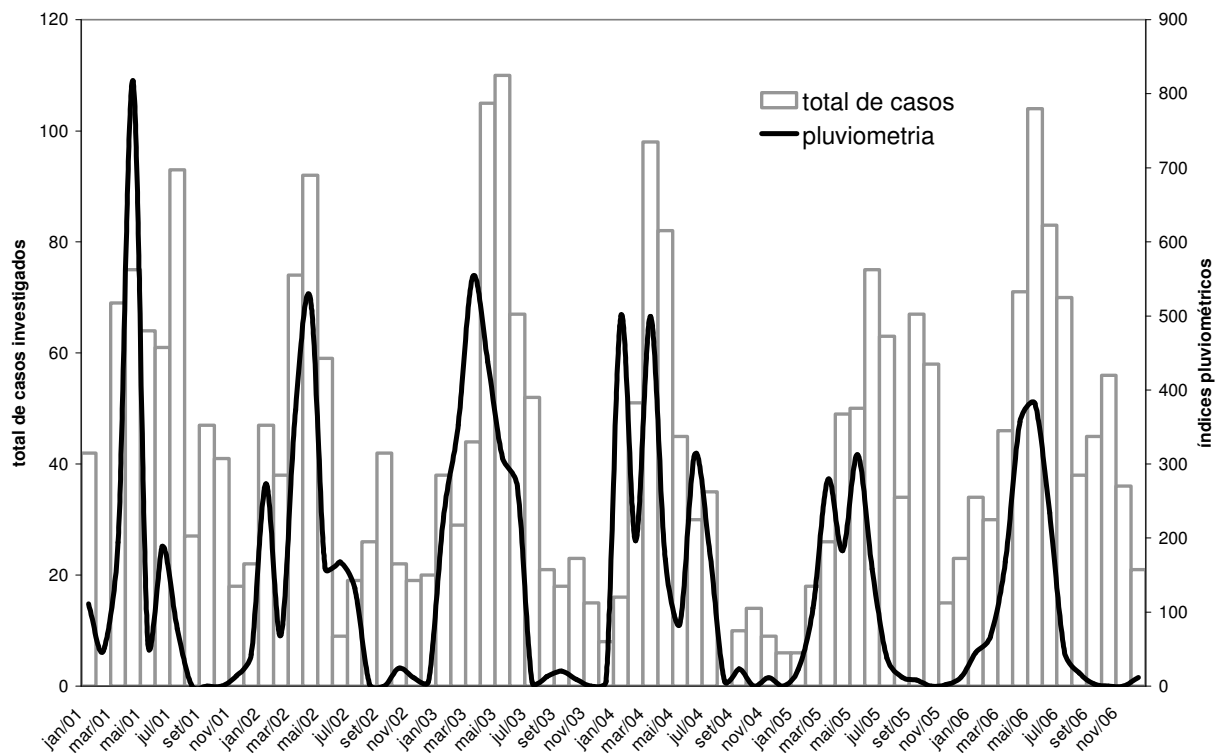


FIGURA 8 – Relação entre número de casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001-2006).

Também foi testada a relação entre os índices pluviométricos e o número de casos de IRAs por Ad, sendo verificada uma ausência de correlação significativa ($p= 0,1484$), e, dessa forma, não se pode admitir nem aumento nem redução no número de casos positivos para Ad no período chuvoso na cidade de Fortaleza (Figura 9).

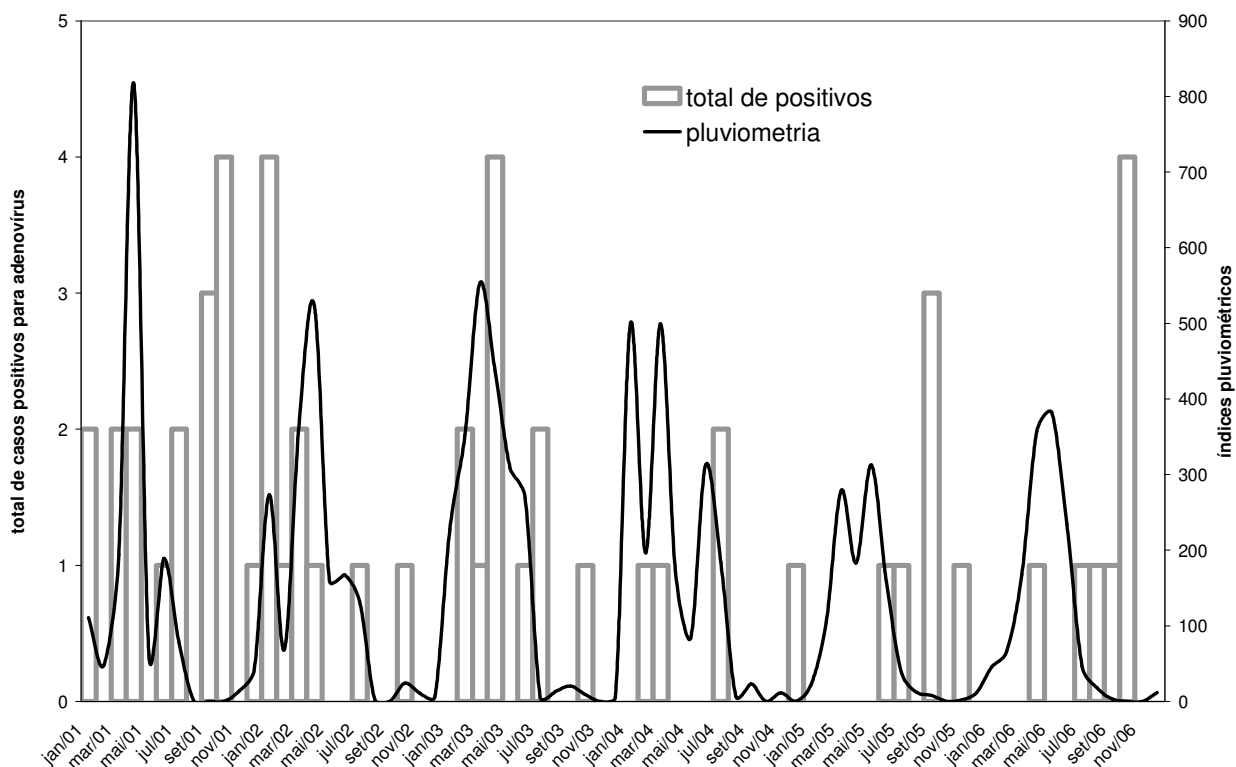


FIGURA 9 – Relação entre número de casos de infecções respiratórias agudas por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin e índices pluviométricos na cidade de Fortaleza (2001-2006).

4.5.3 Correlação dos Casos de IRA por Ad com os Casos Totais de IRA e com os Casos de IRA por Outros Vírus

Para a análise estatística destas correlações foram realizadas comparações entre o número de casos de pacientes com IRA por Ad e o número de casos totais de IRA, bem como com o número de casos de pacientes com IRA por VSR, Flu A e parainfluenza 3.

Analisando-se a frequência de casos de IRA por Ad em 70 dos 72 meses do estudo em que os dados estavam disponíveis, por meio do coeficiente de correlação de Spearman, foi observado um aumento dessa frequência acompanhando o aumento do número total de casos de IRA (Tabela 7). Apesar dessa correlação positiva não foi observado um padrão de sazonalidade para as IRAs por Ad, bem como não houve associação entre os casos de IRA por Ad e pluviometria.

TABELA 7 - Correlação do total de casos de infecções respiratórias agudas e os casos positivos para cada vírus, dentre os mais freqüentemente detectados, em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Correlação	Significância	N
Ad	0,424	0,0003	70
VSR	0,742	0,0000	70
Flu A	0,511	0,0000	70
Parainfluenza 3	-0,093	0,4436	70

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório; N – N° de meses

Também foi feita a comparação entre as freqüências mensais de casos de IRA por Ad e as freqüências dos vírus mais freqüentemente detectados, por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Foi observada correlação entre freqüência de casos de IRA por Ad e casos de IRA por Flu A, mas não entre casos de IRA por Ad e casos de IRA por VSR e parainfluenza 3 (Tabela 8).

TABELA 8 – Correlação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus comparados	Correlação	Significância	N
Ad x VSR	0,184	0,1266	70
Ad x Flu A	0,386	0,0010	70
Ad x Parainfluenza 3	0,138	0,2549	70

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório; N – N° de meses

Para a análise estatística dos dados a seguir foram realizadas comparações entre os casos de pacientes com IRA por Ad e os casos de pacientes com IRA negativa para os vírus pesquisados. Também foram feitas comparações entre os casos de IRA por Ad e os casos de pacientes com IRA por VSR e Flu A, que foram os vírus mais freqüentemente diagnosticados neste estudo.

4.5.4 Sexo

Foi observado dentre os casos de IRA por Ad um leve predomínio de pacientes do sexo masculino que representaram 59,65% dos casos (Tabela 9), com uma proporção masculino / feminino de 1,5 : 1. Porém, ao se analisar a relação entre presença de IRA por Ad e o sexo dos pacientes, utilizando-se o teste exato de Fisher, observa-se que os percentuais de meninos e meninas com resultados positivos para Ad não possuem diferença estatisticamente significativa na comparação com os casos de IRA negativa para os vírus pesquisados ($p=0,4224$), bem como na comparação com os vírus mais freqüentes.

4.5.5 Idade

A maior parte das IRAs por Ad ocorreu em crianças na faixa etária entre sete e 24 meses com 63,15% dos casos. Abaixo desta faixa etária, ou seja, em crianças com idade entre zero e seis meses ocorreram apenas 10,5% dos casos. Nas crianças acima de cinco anos de idade a freqüência foi menor ainda, com apenas 3,5% dos casos (Tabela 9). A média de idade nos pacientes com IRA por Ad foi de 23 meses. Para fazer a comparação entre as idades dos pacientes com IRA por Ad e as idades dos pacientes com IRA negativa foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes. Foi verificado que não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades nos dois grupos ($p=0,8836$). Já na comparação dos casos de Ad com aqueles causados pelos vírus mais freqüentes observou-se que a média de idade dos pacientes com Ad foi superior à dos pacientes com VSR, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,0112$). Por outro lado, a média de idade dos pacientes com Ad foi inferior à dos pacientes com Flu A, também com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0071$).

4.5.6 Setor de Atendimento dos Pacientes

Aproximadamente 51% dos pacientes com IRA por Ad foram atendidos no ambulatório (Tabela 9). Para testar a diferença entre os pacientes com Ad e aqueles negativos para os vírus avaliados em relação ao setor de atendimento, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson. Observou-se que o ambulatório concentrou um maior percentual de casos positivos para Ad que para aqueles negativos para todos os vírus, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0077$). Foi usado o mesmo teste na comparação entre os pacientes com Ad e os pacientes com os vírus mais freqüentes, observando-se também um percentual maior de Ad que de VSR no ambulatório, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0000$), bem como em relação a Flu A ($p=0,0690$).

TABELA 9 – Características demográficas dos pacientes com infecções respiratórias agudas por adenovírus atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Característica	Nº de casos	Percentual
Sexo		
Masculino	34	59,65
Feminino	23	40,35
Idade (meses)		
0-6	6	10,53
7-12	14	24,56
13-18	8	14,03
19-24	14	24,56
25-60	13	22,81
>60	2	3,51
Setor de atendimento		
Ambulatório	29	50,88
Emergência	23	40,35
Enfermarias/UTI	5	8,77

UTI – Unidade de terapia intensiva

4.5.7 Fatores de Risco e Co-morbidades

Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de pacientes com IRA por Ad e os percentuais de pacientes com IRA negativa, com relação aos seguintes fatores de risco pesquisados: aglomeração familiar ($p= 0,1151$), frequência a creche / escola ($p= 1,0000$), ausência de aleitamento materno ($p= 0,4914$), presença de IRA na família ($p= 0,7859$) e fumantes no domicílio ($p= 0,1348$). Na comparação entre os percentuais de pacientes com IRA por Ad e aqueles de pacientes com os outros vírus mais frequentes, foi observado um percentual maior de frequência a creche / escola no grupo de pacientes com IRA por Ad que naquele de pacientes com IRA por VSR ($p= 0,0192$), porém um percentual menor de fumantes no domicílio no grupo de pacientes com IRA por Ad que naquele de pacientes com VSR ($p= 0,0170$). A tabela 10 mostra a frequência de fatores de risco pesquisados nos pacientes com IRA por Ad e nos pacientes negativos para Ad.

TABELA 10 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de fatores de risco.

Fatores de risco	Pacientes negativos para Ad	Pacientes positivos para Ad
Aglomerção familiar*	187 (6,21%)	3 (5,36%)
Frequência a creche/escola	548 (18,31%)	11 (19,64%)
Ausência de aleitamento	364 (11,99%)	6 (10,53%)
Presença de IRA na família	1602 (54,16%)	32 (57,14%)
Fumantes no domicílio	1275 (44,25%)	19 (33,93%)

Ad – Adenovírus; *Mais de três pessoas por cômodo

Da mesma forma, também não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de pacientes com IRA por Ad e os percentuais de pacientes com IRA negativa, ou com IRA pelos outros vírus mais frequentes, com relação às seguintes co-morbidades: prematuridade ($p= 0,4224$), cardiopatia ($p= 0,5875$) e asma ($p= 0,4078$). A tabela 11 apresenta a frequência de co-morbidades pesquisadas nos pacientes com IRA por Ad e nos pacientes negativos para Ad.

TABELA 11 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de co-morbidades.

Co-morbidades	Pacientes negativos para Ad	Pacientes positivos para Ad
Nenhuma	2534 (84,10%)	42 (73,68%)
Prematuridade	223 (7,40%)	2 (3,51%)
Asma	101 (3,35%)	3 (5,26%)
Cardiopatia	41 (1,36%)	0 (0,0%)
Doença neurológica crônica	24 (0,80%)	0 (0,0%)
Pneumopatia crônica	16 (0,53%)	1 (1,75%)
Refluxo gastro-esofágico	11 (0,37%)	0 (0,0%)
Imunossupressão	3 (0,10%)	0 (0,0%)
Outros	25 (0,83%)	1 (1,75%)
Associação de fatores	25 (0,83%)	0 (0,0%)
Não informado	10 (0,33%)	8 (14,04%)
Total	3013 (100%)	57 (100%)

Ad – Adenovírus

4.6 Características Clínicas

4.6.1 Síndromes Clínicas

Dos 3070 pacientes incluídos no estudo, 1699 (55,34%) tinham IVAS e 1196 (38,96%) tinham IVAI. Com relação aos 57 pacientes com IRA por Ad, 40 (70,18%) tiveram o diagnóstico de IVAS e 16 (28,07%) tiveram o diagnóstico de IVAI. A tabela 12 apresenta a distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas nos pacientes com IRA por Ad e nos pacientes negativos para Ad.

TABELA 12 – Distribuição das síndromes clínicas em casos de infecções respiratórias agudas causadas por adenovírus e em casos negativos para este vírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Síndrome clínica	Pacientes negativos para Ad	Pacientes positivos para Ad
IVAS	1659 (55,06%)	40 (70,18%)
Bronquiolite	406 (13,47%)	5 (8,77%)
Pneumonia	712 (23,63%)	10 (17,54%)
Bronquite / crupe	62 (2,06%)	1 (1,75%)
Outras	174 (5,77%)	1 (1,75%)
Total	3013 (100%)	57 (100%)

Ad – Adenovírus; IVAS – Infecções de vias aéreas superiores

Utilizando-se o teste exato de Fisher para comparar os pacientes com Ad com os pacientes negativos em relação ao diagnóstico de IVAS, observou-se um percentual superior nos pacientes com Ad ($p= 0,0779$). Na comparação com os vírus mais frequentes, verificou-se que o percentual de pacientes com IVAS por Ad é bem maior que o de pacientes com IVAS por VSR, e essa diferença é estatisticamente significativa ($p= 0,0000$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de IVAS por Ad e Flu A ($p= 0,6040$) (Tabela 13).

TABELA 13 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os casos negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de IVAS em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	IVAS		Outras síndromes		Total	p-valor
Ad	40	70,18%	17	29,82	57	--
Negativo	1242	58,42%	884	41,58%	2126	0,0779
VSR	199	36,51%	346	63,49%	545	0,0000
Flu A	129	74,57%	44	25,43%	173	0,6040

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; IVAS – Infecção de vias aéreas superiores; VSR – Vírus sincicial respiratório

Utilizando-se o teste exato de Fisher observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de pacientes com qualquer uma das IVAS por Ad e os pacientes negativos para os vírus pesquisados. Comparando-se os pacientes com Ad com aqueles infectados com os vírus mais frequentes, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa na comparação entre Ad e VSR com relação ao diagnóstico bronquiolite ($p=0,0005$) (Tabela 14).

TABELA 14 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais frequentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de bronquiolite em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Bronquiolite				Total	p-valor
	Presença		Ausência			
Ad	5	8,77%	52	91,23%	57	--
Negativo	213	10,02%	1913	89,98%	2126	1,0000
VSR	160	29,36%	385	70,64%	545	0,0005
Flu A	12	6,94%	161	93,06%	173	0,7703

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório

Também foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com Ad e aqueles com VSR quanto ao diagnóstico de pneumonia ($p=0,0331$) (Tabela 15).

TABELA 15 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao diagnóstico de pneumonia em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Pneumonia				Total	p-valor
	Presença		Ausência			
Ad	10	17,54%	47	82,46	57	--
Negativo	484	22,77%	1642	77,23%	2126	0,4240
VSR	173	31,74%	372	68,26%	545	0,0331
Flu A	23	13,29%	150	86,71%	173	0,5132

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório

4.6.2 Sintomas e Sinais

Os principais sintomas e sinais apresentados pelos pacientes com IRA por Ad foram febre, tosse, coriza, anorexia, vômitos e/ou diarreia, obstrução nasal e dispnéia. Entretanto, os percentuais de pacientes com Ad que apresentaram esses sintomas não são muito diferentes dos demais pacientes com IRAs. Outros sintomas e sinais menos comuns foram espirros, cianose, convulsões, otite, conjuntivite e exantema. Também nesse caso não houve grande diferença entre os percentuais dos pacientes com Ad e os percentuais dos demais pacientes com IRAs, com exceção dos dois últimos conforme demonstrado na tabela 16.

TABELA 16 – Distribuição dos casos de infecções respiratórias agudas e de infecções respiratórias por adenovírus em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006 de acordo com a presença de sinais e sintomas.

Sinais e sintomas	Total de pacientes com IRA	Pacientes com IRA por Ad
Febre	2551 (84,08%)	52 (91,23%)
Tosse	2820 (92,19%)	49 (85,96%)
Coriza	2688 (88,60%)	46 (82,14%)
Anorexia	1189 (40,32%)	29 (51,97%)
Vômitos / diarreia	1449 (48,90%)	29 (51,79%)
Obstrução nasal	1558 (52,30%)	28 (49,12%)
Dispneia	1790 (59,47%)	25 (44,64%)
Espirros	1345 (45,97%)	23 (41,07%)
Cianose	106 (3,47%)	1 (1,75%)
Convulsões	72 (2,36%)	0 (0,0%)
Otite	131 (4,30%)	3 (5,45%)
Conjuntivite	110 (3,61%)	9 (16,36%)
Exantema	32 (1,10%)	3 (5,36%)

Ad – Adenovírus; IRA – Infecção respiratória aguda

Foram utilizados o teste qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher para comparar os percentuais de pacientes com IRA por Ad com os percentuais dos pacientes com IRA negativa para os vírus pesquisados, bem como com IRA pelos vírus mais frequentes com relação aos sintomas e sinais. Do total de 57 pacientes com o diagnóstico de IRA por Ad, havia a informação sobre a presença de conjuntivite em apenas 55 deles. Observou-se que os percentuais dos pacientes com Ad que apresentaram conjuntivite foram maiores que aqueles dos pacientes negativos e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,0002$). Também foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os percentuais dos pacientes com Ad e os percentuais dos pacientes com os outros vírus mais frequentes (Tabela 17).

TABELA 17 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à presença de conjuntivite em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Conjuntivite				Total	p-valor
	Presença		Ausência			
Ad	9	16,36%	46	83,64%	55	--
Negativo	77	3,62%	2051	96,38%	2128	0,0002
VSR	10	1,84%	533	98,16%	543	0,0000
Flu A	3	1,76%	167	98,24%	170	0,0002

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório

Também foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre os percentuais dos pacientes com Ad e os percentuais dos outros grupos de pacientes com relação à presença de exantema, sendo encontrados percentuais maiores no grupo de pacientes com Ad (Tabela 18). Os testes foram aplicados em 56 pacientes com IRA por Ad para os quais havia a informação sobre a presença de exantema.

TABELA 18 - Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para os vírus mais freqüentes e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à presença de exantema em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Exantema				Total	p-valor
	Presença		Ausência			
Ad	3	5,36%	53	94,64%	56	--
Negativo	23	1,17%	1642	77,23%	1969	0,0332
VSR	5	0,91%	544	99,09%	549	0,0301
Flu A	--	--	173	100%	173	0,0140

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório

Pacientes com Ad apresentaram percentuais maiores de anorexia quando comparados aos pacientes com VSR, e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,0199$). Foi observada uma relação inversa, ou seja, os percentuais nos pacientes com Ad foram inferiores aos observados nos pacientes negativos para os vírus pesquisados com relação a tosse ($p=0,0762$), dispnéia ($p=0,0540$) e tiragem intercostal ($p=0,1050$). Na

comparação entre pacientes com Ad e os vírus mais frequentes, essa relação inversa se manteve com o VSR, com diferença estatisticamente significativa, em relação a tosse seca ($p= 0,0000$), dispnéia ($p= 0,0000$) e tiragem intercostal ($p= 0,0154$). Para os demais sintomas avaliados não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com Ad e os pacientes sem nenhum vírus, bem como entre pacientes com Ad e outros vírus.

4.6.3 Alterações à Ausculta Pulmonar

A maioria dos pacientes com IRA por Ad apresentou ausculta pulmonar normal. Utilizando-se o teste qui-quadrado de Pearson observou-se que os percentuais de normalidade da ausculta pulmonar nesses pacientes foram superiores aos dos pacientes infectados pelo VSR ($p= 0,0000$), e para os pacientes negativos para os vírus analisados ($p= 0,0104$) (Tabela 19).

TABELA 19 – Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação à ausculta pulmonar em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Normal	Sibilos/roncos	Crepições	Outros	Total	p-valor
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		
Ad	33 (60,0)	13 (23,64)	8 (14,55)	1 (1,82)	55	--
Negativo	829 (39,33)	820 (38,90)	244 (11,57)	215 (10,20)	2108	0,0104
VSR	130 (23,99)	213 (39,30)	102 (18,82)	97 (17,90)	542	0,0000
Flu A	97 (56,73)	48 (28,07)	14 (8,19)	12 (7,02)	171	0,3873

Ad – Adenovírus; Flu A – Vírus influenza A; VSR – Vírus sincicial respiratório

4.6.4 Alterações Radiológicas

Foram realizados exames radiológicos em 1299 dos 3070 pacientes com IRA, sendo encontrada alguma alteração em aproximadamente 75% deles. Os principais achados foram condensação (31,1%), infiltrado intersticial (23,5%) e hiperinsuflação (23,2%). Dentre os 57 pacientes com IRA por Ad, 20 realizaram raios-X de tórax, com alterações observadas em 60% deles. As alterações mais frequentes em ordem decrescente foram: infiltrado intersticial (35%), condensação (20%) e hiperinsuflação (5%). Utilizando-se o teste qui-quadrado de Pearson, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de pacientes com IRA por Ad e os percentuais de pacientes com IRA negativa em relação aos achados radiológicos. Entretanto foi observada uma correlação

negativa estatisticamente significativa entre os pacientes com Ad e aqueles com VSR com relação à hiperinsuflação ($p= 0,0052$), ou seja, o percentual de pacientes com Ad que apresentavam a alteração foi significativamente inferior ao de pacientes com VSR.

4.6.5 Tratamento

Para 2900 dos 3070 pacientes com IRA havia informações sobre a instituição de tratamento com antibióticos. O percentual de utilização de antibióticos por esses pacientes ficou em torno de 31%, que é muito próximo ao dos pacientes com Ad. Utilizando-se o teste exato de Fisher verificou-se que o percentual de utilização de antibióticos pelos pacientes com IRA por Ad não apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação com os pacientes com IRA negativa para os vírus investigados ($p= 0,6594$), bem como na comparação com os pacientes com VSR ($p= 0,2016$) e com Flu A ($p= 0,2133$).

Mais da metade dos pacientes com IRA fez uso de aerossol / salbutamol (57,12%). Porém o percentual de pacientes com IRA por Ad que fez uso dessa terapêutica foi levemente inferior ao dos pacientes com IRA não associada a nenhum dos vírus pesquisados ($p= 0,0788$). Além disso, o percentual de pacientes com IRA por Ad que foi tratado com aerossol foi inferior ao percentual dos que apresentaram IRA por VSR, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0000$) (Tabela 20).

TABELA 20 – Comparação dos casos positivos para adenovírus com os casos positivos para outros vírus e com os negativos para todos os vírus pesquisados em relação ao uso de aerossol / salbutamol em pacientes atendidos no Hospital Infantil Albert Sabin no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006.

Vírus	Não utilização	Utilização	Total	p-valor
	N (%)	N (%)		
Ad	33 (57,89)	24 (42,11)	57	--
Negativo	914 (45,29)	1104 (54,71)	2018	0,0788
VSR	131 (24,53)	403 (75,47)	534	0,0000
Flu A	103 (60,95)	66 (39,05)	169	0,7548

Poucos pacientes com IRA por Ad precisaram fazer uso de oxigênio (7,02%) e não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre o percentual dos pacientes com Ad e o percentual dos pacientes negativos para os vírus pesquisados, bem como o daqueles com outros vírus, em relação a oxigenioterapia.

Com relação ao uso de corticóides, 5,26% dos pacientes com IRA por Ad precisaram fazer uso desses medicamentos. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual dos pacientes com IRA por Ad e o percentual dos pacientes com IRA negativa para os vírus pesquisados ($p= 0,2021$). Na comparação com os pacientes com IRA pelos vírus mais freqüentes verificou-se que o percentual dos pacientes com Ad foi inferior ao dos pacientes com VSR que necessitaram de corticoterapia, achado estatisticamente significativo ($p= 0,0001$).

5 DISCUSSÃO

As IRAs virais são uma causa importante de morbidade infantil e, nos países em desenvolvimento, devido a fatores sociais, nutricionais e ambientais, o risco de morte por IVAI causadas por vírus é muito maior que nos países desenvolvidos (FARNG *et al.*, 2002; VIDELA *et al.*, 1998).

Estudos sobre a epidemiologia das IRAs virais nos países em desenvolvimento ainda são escassos. No Brasil, até a década de 90, a maioria dos estudos sobre esse tema era realizada nas regiões Sul e Sudeste (COSTA *et al.*, 2006; KAJON *et al.*, 1999; MIYAO *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 1991; PORTES *et al.*, 1998; PRIETSCH *et al.*, 2002; STRALIOTTO *et al.*, 2002; STRALIOTTO *et al.*, 2004; SUTMOLLER; MAIA, 1995; TSUCHIYA *et al.*, 2005). Até então, o único trabalho publicado sobre viroses respiratórias realizado no nordeste do Brasil, analisava a ocorrência de IRAs virais em crianças de uma comunidade pobre da cidade de Fortaleza (ARRUDA *et al.*, 1991). No ano de 2001 é produzido o segundo trabalho sobre vírus respiratórios nessa região e a partir de então é crescente o número de publicações sobre vírus e viroses respiratórias, todas tendo crianças como população de estudo (FAÇANHA, 2005; FÉ, 2007; MARTINS, 2005; MOURA, 2001; MOURA *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2006; NUNES; MOURA, 2006; OLIVEIRA; SÁ; CRUZ, 2004; SOUZA *et al.*, 2003).

Com relação a estudos sobre Ad relacionados exclusivamente a quadros de infecções respiratórias, os primeiros estudos brasileiros são da década de 60 (BRUNO-LOBO; PEREIRA; PEREIRA, 1961; CARVALHO, 1960). Nos anos 70 iniciam-se as publicações de dados relativos à análise genômica de adenovírus isolados de infecções respiratórias (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 1988; KAJON *et al.*, 1999; MORAES *et al.*, 1997; MORAES *et al.*, 1998; MOURA, 2001; MOURA *et al.*, 2007). Este estudo é o primeiro especificamente relacionado a Ad associados a IRAs infantis realizado em Fortaleza. Por se tratar de um estudo retrospectivo, em que foram analisados mais de três mil casos de IRAs coletados em seis anos consecutivos, envolvendo crianças de todas as faixas etárias, atendidas em ambulatório, emergência e enfermarias de um hospital de referência, as informações obtidas a partir dele permitirão preencher, pelo menos em parte, uma lacuna grande relativa a informações sobre a epidemiologia e a clínica das IRAs por Ad na região nordeste do Brasil.

As taxas de detecção viral em amostras respiratórias são muito variáveis e dependem de fatores como: tipo de amostra clínica analisada, população de estudo, local de coleta de amostras, vírus pesquisados, métodos de detecção utilizados, tempo de estudo. Um dos

principais fatores que têm sido responsável por ampla variação nessas taxas de IRAs virais é o método empregado para identificação de vírus nas amostras clínicas. Estudos que empregam métodos mais sensíveis como a RT-PCR tendem a apresentar taxas de detecção viral maiores (KUSEL *et al.*, 2006; LEGG *et al.*, 2005). Estudos com associação de métodos para detecção de um espectro maior de vírus também apresentam um número maior de amostras positivas que aqueles que empregam um único método (COSTA *et al.*, 2006; JENNINGS *et al.*, 2004). O desenvolvimento de técnicas de identificação de microrganismos cada vez mais sensíveis e a identificação de novos agentes têm permitido um percentual mais alto de identificação de vírus em amostras clínicas, mas mesmo assim um número considerável de IRAs permanece sem um agente etiológico identificado.

A utilização da IFI em nosso estudo baseou-se no impacto clínico e epidemiológico resultante de seu emprego, além do fato da mesma ser uma das técnicas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde, especialmente quando se refere ao diagnóstico de IRAs em países em desenvolvimento (ORSTAVIK *et al.*, 1984). A sensibilidade, especificidade e a rapidez da execução da IFI fazem com que a mesma seja de grande importância para os clínicos que a utilizam com o objetivo de orientar no tratamento individual de pacientes, tornando a terapia mais racional e econômica, reduzindo a permanência hospitalar e o uso de antibióticos, além de poder ser usada no controle de infecções hospitalares cruzadas (MINNICH; RAY, 1980; PORTILLO; CRUZ, 2000; SHETTY *et al.*, 2003). Além disso, a IFI permite ao pesquisador analisar a qualidade da amostra através da microscopia. O processamento da amostra, a execução da técnica de IFI e leitura podem ser concluídos dentro de 4 horas após coletada a amostra. Outra vantagem da IFI feita a partir do aspirado de nasofaringe é que se esse espécime for acondicionado sob refrigeração (4°C), os antígenos virais nele existentes podem ser detectados em até 48 horas após a coleta (SIQUEIRA; FERREIRA; NASCIMENTO, 1986). A sensibilidade da imunofluorescência para detecção de Ad em aspirados de nasofaringe de crianças é de 73% a 90% e consideravelmente inferior em adultos (MOURA, 2001; RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). A utilização dessa técnica em amostras coletadas nos quatro primeiros dias de apresentação de sintomas aumenta a sensibilidade da técnica. Nesse estudo a maioria das amostras foi coletada nessa fase da doença.

O percentual de amostras positivas para os vírus pesquisados nesse estudo, que foi de 30,39%, está muito próximo aos de 32%-38,7% encontrados em outros estudos nacionais que pesquisaram este mesmo grupo de vírus, usando o mesmo método (MOURA, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2002; STRALIOTTO *et al.*, 2004). Alguns estudos nacionais ampliaram o espectro de vírus pesquisados, utilizando isolamento viral, e estes percentuais

oscilaram um pouco mais, indo de 25% a 43% (ARRUDA *et al.*, 1991; NASCIMENTO *et al.*, 1991). Um estudo brasileiro que apesar de incluir a pesquisa de rinovírus, enterovírus e herpesvírus (por isolamento viral em várias linhagens celulares), além dos vírus pesquisados neste estudo, teve um percentual de 27,1% de amostras positivas, ou seja, um percentual inferior ao encontrado neste estudo (PORTES *et al.*, 1998). A combinação de isolamento viral, imunofluorescência e RT-PCR permitiu a detecção de vírus em 48,3% das amostras analisadas em um estudo realizado em Salvador com crianças atendidas em uma creche (SOUZA *et al.*, 2003). A taxa mais elevada de detecção viral (75,4%) em amostras clínicas de pacientes com IRAs, em estudos brasileiros, foi atingida em um estudo que empregava, além da imunofluorescência indireta para os vírus pesquisados neste estudo, a RT-PCR para metapneumovírus e rinovírus (COSTA *et al.*, 2006).

Nos estudos internacionais, que utilizam o isolamento em cultura de células para o diagnóstico de IRA viral, a taxa de detecção viral varia entre 26% a 42% na maioria deles, ou seja, taxas semelhantes àsquelas encontradas nos estudos brasileiros que empregaram esse mesmo método diagnóstico (ARRUDA *et al.*, 1991; CHEW *et al.*, 1998; KIM; LEE; LEE, 2000; LAGOS; AVENDAÑO; LEVINE, 1999; LIN *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 1991; REINA *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2001). Contudo, um estudo realizado no México que utilizou quatro linhagens diferentes de células para isolamento viral, apresentou uma taxa de detecção desses microrganismos de 65% (CABELLO *et al.*, 2006).

A utilização da RT-PCR como único método de identificação viral em amostras clínicas tem sido cada vez mais freqüente, identificando vírus em percentuais que variam de 67% a 83% (ARDEN *et al.*, 2006; KUSEL *et al.*, 2006; LEGG *et al.*, 2005), levando a crer que este seria um método bastante promissor para a pesquisa dos vírus respiratórios nos pacientes com IRA. Entretanto, devido à sensibilidade muito elevada das técnicas de PCR, torna-se difícil distinguir entre o material genético residual de infecções prévias e os vírus que estão em replicação numa atual infecção. Assim, a interpretação dos resultados dos métodos de detecção de ácidos nucléicos, quando usados isoladamente, deve ser bastante criteriosa (LARCHER *et al.*, 2006). O uso combinado de imunofluorescência, isolamento viral em cultura de células, PCR e RT-PCR em um estudo sobre IVAI em crianças hospitalizadas permitiu a identificação de pelo menos um vírus em 87% das amostras analisadas (JENNINGS *et al.*, 2004). O uso de PCR em tempo real para detecção de vírus respiratórios aumentou em 40% a taxa de identificação viral nas amostras clínicas que haviam sido analisadas por IFI (KUYPERS *et al.*, 2006).

O percentual de co-infecções encontrado neste estudo (1,1%) foi pequeno em comparação ao que está relatado em diversos estudos. Nesse aspecto são citadas taxas que

variam entre 0,9% e 27% (JENNINGS *et al.*, 2004; KIM; LEE; LEE, 2000; LAGOS *et al.*, 1999; LARRAÑAGA *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2001). As maiores taxas de co-infecção viral são citadas em estudos que empregam PCR, RT-PCR ou PCR em tempo real isoladas ou em associação com métodos clássicos de diagnóstico viral (JENNINGS *et al.*, 2004; JUVÉN *et al.*, 2000; KUSEL *et al.*, 2006; LEGG *et al.*, 2005). Mais uma vez vale a pena ressaltar que os métodos de biologia molecular quando usados isoladamente podem ser difíceis de interpretar em casos de infecções por dois ou mais patógenos, pois alguns vírus respiratórios podem persistir por períodos prolongados de tempo na nasofaringe sem causar sintomas. Além disso, ácidos nucleicos não infecciosos de rinovírus ou VSR podem ser detectados até vários meses após uma infecção (LARCHER *et al.*, 2006). Quanto às co-infecções em que os Ad participaram, neste estudo foram identificados 11 casos. Em um estudo recente que utilizou imunofluorescência e PCR em tempo real para identificação de vírus em amostras respiratórias, o Ad foi citado como vírus mais freqüente em casos de co-infecção (KUYPERS *et al.*, 2006).

Os percentuais de detecção de Ad em diversos estudos variam de 0 a 12,7% (AHN *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2004; DINIZ *et al.*, 2003; JENNINGS *et al.*, 2004; LEGG *et al.*, 2005; REINA *et al.*, 2004). Os fatores que influenciam na detecção de vírus de uma maneira geral podem também influenciar a identificação específica de Ad. No estudo no qual não se detectou nenhum Ad, Diniz e cols. (2003) pesquisavam a presença dos mesmos vírus analisados neste estudo através de IFI em prematuros que necessitaram de ventilação mecânica. No estudo com maior detecção de Ad, utilizou-se uma combinação de métodos (imunofluorescência, isolamento viral em cultura celular, PCR e RT-PCR) e a população de estudo era composta de crianças hospitalizadas por IVAI (JENNINGS *et al.*, 2004).

O Ad foi o quarto vírus mais freqüentemente detectado neste estudo, após VSR, FLU A e parainfluenza 3. A ordem de freqüência dos Ad em relação a diversos vírus respiratórios varia muito quando se revisa a literatura. Um estudo realizado na cidade de Salvador (Bahia) apresentou um resultado semelhante ao aqui apresentado, ou seja, os Ad foram menos freqüentes que RSV, FLU A e parainfluenza 3 (MOURA, 2001). É interessante ressaltar que a população desses dois estudos foi atendida em hospitais pediátricos universitários públicos composta em sua maioria por pacientes que retornavam às suas residências após atendimento, apesar de que no estudo de Salvador não foram incluídas crianças atendidas em ambulatórios. Outra diferença com relação ao estudo de Salvador é que todas as amostras analisadas foram submetidas ao isolamento viral em cultura de células e a imunofluorescência, o que difere do nosso estudo por ter se baseado principalmente na imunofluorescência. A inoculação de todas as amostras coletadas em células HEp-2 permitiu

o isolamento de Ad em três amostras negativas por IFI, o que representou um acréscimo de 27,2% na identificação desses vírus no estudo de Salvador.

O único estudo brasileiro onde foi pesquisada a etiologia viral de IRAs em crianças de creche mostrou que os Ad representavam 5,9% dos agentes virais dessas infecções. No entanto, em relação aos outros vírus pesquisados, os Ad foram o quarto em frequência, após rinovírus, enterovírus e parainfluenza 3 (SOUZA *et al.*, 2003).

Resultados de dois estudos realizados em Porto Alegre (Rio Grande do Sul) mostram os Ad como segundo vírus mais frequentemente detectado em casos de IRAs infantis, logo após o VSR com percentuais de detecção de 6,6% e 7,7% (STRALIOTTO *et al.*, 2002; STRALIOTTO *et al.*, 2004). Nesses dois estudos destaca-se o papel dos Ad como agente de IRAs em pacientes hospitalizados. Um desses estudos analisa a ocorrência dos mesmos vírus aqui pesquisados em uma unidade de tratamento intensivo pediátrica, com um percentual de detecção de Ad em 7,7% dos casos (STRALIOTTO *et al.*, 2004). No outro, 50% das IRAs causadas por Ad ocorreram em pacientes hospitalizados (STRALIOTTO *et al.*, 2002). Em outros estudos nacionais sobre IRAs virais, em pacientes ambulatoriais e/ou hospitalizados, o Ad ficou com a segunda ou terceira posição, com percentuais que variaram entre 0,3% e 10% (ARRUDA *et al.*, 1991; NASCIMENTO *et al.*, 1991; OLIVEIRA; SÁ; CRUZ, 2004; PORTES *et al.*, 1998; TSUCHIYA *et al.*, 2005). Dentre esses estudos vale a pena ressaltar um realizado em Maceió (Alagoas) onde foram incluídos crianças e adultos atendidos em ambulatórios e centros de saúde que manifestavam sintomas semelhantes aos de gripe. Nesse estudo foi publicado pela primeira vez o resultado sobre a vigilância de influenza naquela cidade e os Ad foram o segundo vírus mais frequentemente detectado, após o FLU A, sendo responsáveis por 10% dos casos de IRAs analisadas (OLIVEIRA; SÁ; CRUZ, 2004) .

Aproximadamente 76% das amostras positivas para Ad por IFI foram inoculadas em monocamadas de células HEp-2 com isolamento de Ad em 78% das amostras inoculadas. Embora o isolamento de Ad seja considerado o padrão ouro no diagnóstico de infecções por Ad, esse método não pôde ser aplicado para todas as amostras deste estudo, mas unicamente para aquelas positivas para Ad por IFI, devido aos altos custos do isolamento viral e ao tempo utilizado nessa técnica. Com relação ao isolamento de Ad em cultura de células a partir de amostras do trato respiratório a sensibilidade desse método varia entre 85% e 100% (RUUSKANEN; MEURMAN; AKUSJÄRVI, 1997). Os Ad produzem um efeito citopático característico, com arredondamento das células que tendem a ficar em forma de cachos de uva. Com a progressão do ECP, a camada celular frequentemente aparece como uma malha que eventualmente pode se destacar da parede do tubo. A velocidade com que o ECP se desenvolve varia de acordo com a cepa e pode levar de dois dias a três semanas (RAY;

MINNICH, 1991). Neste estudo, a formação de ECP ocorreu em um período variável de tempo, que foi de dois a 16 dias, com uma média de seis dias. Entre algumas possibilidades que podem justificar a falha no isolamento de Ad a partir de amostras positivas por IFI, podemos citar a qualidade da amostra e a possibilidade de participação de sorotipos de difícil isolamento, como os tipos 40 e 41, como agentes de IRAs. Sabe-se que esses sorotipos estão geralmente associados a quadros de gastroenterites infantis, embora possam também causar quadros de IRAs. Quanto ao isolamento de Ad em amostras negativas por IFI, isso se deve a maior sensibilidade do isolamento viral em cultura de células em relação à imunofluorescência para Ad. Como já citado nessa discussão entre 488 amostras de SNF inoculadas em células HEp-2 em um estudo de Salvador, foram isolados três Ad que não haviam sido identificados por IFI. Ou seja, a utilização de métodos com maior sensibilidade aumenta a chance de detecção de Ad na amostra clínica. Um estudo recente, comparando o uso de IFI e PCR em tempo real para detecção de vírus respiratórios, mostrou a alta sensibilidade da PCR em tempo real em relação a IFI, pois o Ad foi detectado em 101 de 187 amostras negativas por IFI. A alta sensibilidade da PCR em tempo real ficou caracterizada nesse estudo, pois nas amostras em que esse método foi positivo e a IFI foi negativa provavelmente havia uma pequena quantidade de vírus nas amostras (KUYPERS *et al.*, 2006). Todas as cepas isoladas neste estudo foram congeladas em *freezer* a -70°C e poderão ser utilizadas em outros estudos sobre diversidade antigênica e genômica de Ad.

Alguns vírus, como o VSR e o FLU A, apresentam padrões de sazonalidade, tanto em países de clima temperado, como em países de clima tropical, onde os períodos epidêmicos desses dois agentes são associados aos meses de inverno, mais frios, em países de clima temperado e à estação de chuvas em países de clima tropical (ARRUDA *et al.*, 1991; MARTINS, 2005; MOURA *et al.*, 2006; SHEK; LEE, 2003). As infecções por Ad neste estudo ocorreram em baixa frequência, sendo que nos primeiros quatro anos de estudo elas foram distribuídas nos diversos meses de cada ano e nos últimos dois anos de estudo tiveram uma distribuição mais restrita. Portanto, assim como tem sido relatado em vários estudos, também em Fortaleza, as infecções por Ad podem acontecer ao longo do ano sem qualquer padrão de sazonalidade característico (LIN *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 1991; SHEK; LEE., 2003). O modo de distribuição das infecções por Ad observada neste estudo já havia sido relatado em um estudo de IRAs virais em crianças de Fortaleza realizado na década de 80, quando o período de estudo se restringiu a 29 meses (ARRUDA *et al.*, 1991). Também no que se refere à ocorrência de IRAs virais em Fortaleza, essa característica das infecções por Ad difere do que já foi observado em relação ao VSR e ao FLU A, cujos períodos epidêmicos estão associados a estação de chuvas e ao parainfluenza 3 que ocorre predominantemente na

estação seca (FÉ, 2007; MARTINS, 2005; MOURA *et al.*, 2006). Surtos esporádicos de IRAs por Ad no inverno e primavera têm sido relatados em alguns estudos (COSTA *et al.*, 2006; KIM; LEE; LEE, 2000; REINA *et al.*, 2004; STRALIOTTO *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2001). Está bem demonstrada a tendência epidemiológica dos Ad em causar surtos de conjuntivite e faringoconjuntivites durante a estação da primavera, provavelmente por reativação de Ad a partir de reservatórios amigdalianos (REINA *et al.*, 2004). A ocorrência ao longo do ano com pico no verão foi relatada em um estudo realizado no México (CABELLO *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos sobre IRAs virais infantis mostra um predomínio de acometimento em pacientes do sexo masculino (CABELLO *et al.*, 2006; KIM; LEE; LEE, 2000; LIN *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 1991). O mesmo tem sido relatado em crianças infectadas por Ad, em que a proporção masculino / feminino varia entre 1,25:1 e 1,45:1 (CHEN *et al.*, 2004; DALMÁS *et al.*, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; REINA *et al.*, 2004; ROCHOLL *et al.*, 2004), podendo atingir proporções tão grandes quanto 2,04:1 (KIM; LEE; LEE, 2000). Neste estudo foi verificada uma proporção que se aproxima daquela encontrada pela maioria dos autores.

Com relação à idade, verificou-se uma nítida redução da freqüência de IRA por Ad em crianças a partir dos dois anos, que coincidiu com a queda na freqüência dos casos de IRA por todas as etiologias. Vários estudos mostram resultados similares (CABELLO *et al.*, 2006; CHEW *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2006; KIM; LEE; LEE, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 1991). Até os seis meses de idade é pequena a incidência de infecções por Ad devido à proteção dos anticorpos maternos (HONG *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2000; WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). Neste estudo verificamos que apenas 10% dos pacientes com IRA por Ad se incluíam nessa faixa etária, percentual parecido com aqueles obtidos por outros autores, que vão de 9,2% a 14% (CHEW *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2006). Apenas duas crianças apresentaram infecção por Ad no primeiro mês de vida, o que está de acordo com dados da literatura. As IRAs observadas nessas duas crianças apresentaram-se como IVAS, embora o mais observado é que nessa faixa etária as IRAs por Ad são graves e geralmente fatais (ELNIFRO *et al.*, 2005).

Muitos estudos sobre Ad restringem-se à análise de IVAI em pacientes hospitalizados, o que gera uma associação freqüente desses agentes a IRAs de apresentação mais grave (CHEN *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2001; LARRAÑAGA *et al.*, 2000). Contudo, no presente estudo, a hospitalização em casos de IRA por Ad correspondeu à minoria dos casos (12,3%), característica que ressalta o aspecto de menor gravidade do quadro de apresentação da IRA que levou o paciente ao hospital, pois resultou em retorno do paciente

para casa sem necessidade de hospitalização. Entre 11 Ad detectados em casos de IRAs virais infantis que aconteceram em um período de 12 meses na cidade de Salvador, 18% foram identificados em pacientes hospitalizados (MOURA, 2001). Dois estudos realizados em Porto Alegre destacam o papel dos Ad como agentes de IRAs em pacientes hospitalizados. Um desses estudos analisa a ocorrência dos mesmos vírus aqui pesquisados em uma UTI pediátrica, com um percentual de detecção de Ad em 7,7% dos casos (STRALIOTTO *et al.*, 2004). No outro, 50% das IRAs causadas por Ad ocorreram em pacientes hospitalizados (STRALIOTTO *et al.*, 2002). No entanto, um percentual de até 90% de IRAs por Ad em crianças hospitalizadas já foi citado (REINA *et al.*, 2004). Cerca de 51% dos pacientes com IRA por Ad deste estudo foram atendidos em ambulatórios, fato também observado em um estudo realizado com crianças do Rio de Janeiro, onde o ambulatório correspondeu a 47% do local de atendimento das crianças com essas infecções. O Ad foi o segundo vírus mais identificado em casos de IRAs que se manifestaram com quadros gripais nas unidades sentinelas de vigilância de influenza na cidade de Maceió (OLIVEIRA; SÁ; CRUZ, 2004). Nenhum Ad foi identificado entre 101 casos de IRAs em crianças atendidas em um centro de saúde da cidade de Belém (RODRIGUES *et al.*, 2004). Do mesmo modo nenhum Ad foi identificado em casos de IRA em 68 prematuros submetidos à ventilação mecânica em uma unidade neonatal de tratamento intensivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005).

Alguns estudos apontam para a influência de fatores de risco no desenvolvimento de IRAs, como precárias condições de moradia, aglomeração familiar, tabagismo materno, baixo nível de escolaridade materna, desmame precoce e desnutrição (PRIETSCH *et al.*, 2002; SUTMOLLER; MAIA, 1995). Estudos que avaliaram crianças com IRA por Ad citaram fatores mais específicos. Reina e cols. (2004) implicaram antecedentes prévios de outras doenças respiratórias (bronquiolite ou asma) e antecedentes familiares de broncopatias crônicas no favorecimento de IRAs por Ad. Munoz e cols. (1998) atribuíram à prematuridade, à doença pulmonar crônica e a anomalias cardíacas possível efeito contribuinte para a gravidade da infecção por Ad em seus pacientes. Neste estudo não foi possível confirmar a influência dos fatores de risco avaliados sobre o desenvolvimento de IRA por Ad ao se comparar esses pacientes com aqueles negativos para os vírus pesquisados.

A maioria dos pacientes com IRA por Ad em nosso estudo teve o diagnóstico de IVAS (70,2%), de modo similar a outros estudos brasileiros, que apresentaram percentuais de 50% a 73% e incluíam pacientes ambulatoriais, hospitalizados e de creches (COSTA *et al.*, 2006; MOURA, 2001; SOUZA *et al.*, 2003). O percentual de pacientes com diagnóstico de IVAS foi bastante inferior nos estudos que incluíam somente ou predominantemente crianças

hospitalizadas, indo de 8% a 14% (KIM; LEE; LEE, 2000; REINA *et al.*, 2004). Fica claro nesses estudos que esses casos de IVAS em pacientes hospitalizados representam manifestações de IRAs hospitalares, uma vez que não se justifica a hospitalização de crianças por IVAS, com exceção de quadros de emergência como epiglottites. Surto hospitalares de IVAS por Ad são citados em alguns estudos (NAJIOULLAH *et al.*, 2004; SHING-NAZ; BROWN; GANESSHANANTHAN, 1993). Nenhum caso de IRA hospitalar por Ad foi observado entre as crianças internadas no HIAS.

Com relação às IVAI por Ad, o principal diagnóstico nos nossos pacientes foi pneumonia (17,5%), seguida de bronquiolite (8,8%). A predominância de pneumonia também foi observada nos estudos que avaliam IVAI em crianças hospitalizadas, nos quais os percentuais de pacientes com pneumonia por Ad variaram de 63% a 93% e os de bronquiolite ficaram entre 1,5% e 33% (HONG *et al.*, 2001; CHUANG *et al.*, 2003; DALMÁS *et al.*, 2003; LARRAÑAGA *et al.*, 2000; VIDELA *et al.*, 1998). Trabalhos que avaliaram pacientes com IRAs em geral mostraram resultados conflitantes. Em um desses estudos foram observados mais casos de pneumonia (51%) que de bronquiolite (21%) (KIM; LEE; LEE, 2000). Entretanto, alguns estudos apresentaram predomínio de casos de bronquiolite, com percentuais variando de 21% a 61%, e menor percentual de casos de pneumonia, indo de 10% a 14% (COSTA *et al.*, 2006; REINA *et al.*, 2004; ROCHOLL *et al.*, 2004).

Os sintomas das IRAs por Ad são, em geral, inespecíficos e muitos deles são comuns a diversas infecções respiratórias virais (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). A maioria dos estudos sobre IRA por Ad mostra um perfil de sintomas que inclui febre, acometendo entre 67% e 100% dos pacientes; tosse, presente em 85% a 100% dos casos; e sintomas gastrintestinais, sendo o mais comum deles a diarreia (CHEN *et al.*, 2004; DALMÁS *et al.*, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; FARNG *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2000). Nos estudos que avaliam crianças com IVAS ou IRAs em geral é comum o relato de amigdalite ou otite média (CHEN *et al.*, 2004; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2000). Por outro lado, é comum a presença de taquipnéia ou dispnéia em pacientes com IVAI por Ad (DALMÁS *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2001; REINA *et al.*, 2004). Em um estudo que comparou as características clínicas de pneumonia por Ad e por outras etiologias, verificou-se que esses sintomas foram significativamente mais frequentes nas crianças com Ad (FARNG *et al.*, 2002). Neste estudo, a febre e a tosse também foram os sintomas predominantes nos pacientes com IRA por Ad. Também foram comuns a coriza, a obstrução nasal e os espirros, refletindo a preponderância de casos de IVAS nos pacientes do estudo. Diferente do que foi observado no estudo conduzido por Farng e cols. (2002), neste estudo os pacientes com IRA por Ad apresentaram

menos dispnéia que os pacientes com IRA por VSR ou por outras etiologias que não os vírus pesquisados, indicando que esses agentes provavelmente causariam mais prejuízo à função pulmonar que os outros agentes daquele estudo.

Neste estudo a conjuntivite esteve presente num percentual bastante maior de pacientes com IRA por Ad que nos pacientes com outros vírus ou naqueles sem nenhum vírus detectado. Quase todos os estudos relatam a presença de conjuntivite nos pacientes com IRA por Ad, com percentuais que podem chegar até a 33% (CHEN *et al.*, 2004; CHUANG *et al.*, 2003; DALMÁS *et al.*, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; FARNG *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2000; ROCHOLL *et al.*, 2004).

Outro sintoma comum nos pacientes com IRA por Ad é o exantema, que pode aparecer em 5% a 31% dos pacientes (CHEN *et al.*, 2004; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; FARNG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2000; ROCHOLL *et al.*, 2004). Neste estudo, esteve presente em 5,4% dos pacientes, sendo este percentual significativamente superior ao encontrado nos pacientes com outros vírus ou sem nenhum dos vírus pesquisados.

Em estudos incluindo pacientes com IVAI por Ad as alterações mais comuns à ausculta pulmonar são as crepitações, com percentuais entre 81% e 100%, e os sibilos, que chegam a 42%. Esses pacientes podem apresentar ainda murmúrio vesicular rude ou diminuído (FARNG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2001). Chen e cols. (2004) encontraram percentuais mais baixos, com a presença de sibilos e/ou crepitações em cerca de 23% dos pacientes, mas seu estudo avalia pacientes com IRAs de uma maneira geral, com muitos pacientes apresentando IVAS. Nosso estudo se assemelha a esse, com a presença de sibilos em 23,6% dos pacientes com IRA por Ad e crepitações em 14,5%. Porém esses percentuais não apresentam diferença significativa quando comparados aos pacientes com outros vírus ou sem nenhum dos vírus pesquisados. Se levarmos em conta apenas os pacientes com IVAI por Ad, observamos a presença de crepitações em 50% e sibilos em 37,5% destes pacientes.

O percentual de tiragem intercostal nos pacientes com IRA por Ad foi inferior ao percentual nos pacientes com outros vírus ou naqueles negativos para os vírus pesquisados. A diferença foi significativamente maior na comparação com VSR. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Farnng e cols. (2002) em que pacientes com pneumonia por Ad tiveram esse sinal mais freqüentemente que os pacientes com outras etiologias. Essa diferença se explica pelo grande percentual de pacientes com IVAS por Ad em nosso estudo e pela elevada freqüência de pneumonia e bronquiolite nos pacientes com VSR.

As principais alterações observadas nos raios-X de tórax dos pacientes com IRA por Ad foram o infiltrado intersticial e a condensação pulmonar. Apenas um paciente

apresentou achado radiográfico de hiperinsuflação. Embora o percentual de pacientes positivos para Ad com infiltrado intersticial seja superior ao dos pacientes negativos para os vírus pesquisados, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Com relação às outras duas alterações, os percentuais de pacientes com Ad foram inferiores aos dos pacientes sem nenhum vírus, e mesmo assim, essa diferença não foi significativa. No total, essas alterações foram encontradas em 60% dos pacientes que realizaram raios-X de tórax. Em dois estudos com características semelhantes ao nosso, um realizado na Espanha (REINA *et al.*, 2004) e outro nos Estados Unidos (ROCHOLL *et al.*, 2004), foram encontrados percentuais totais de alterações radiológicas similares aos observados em nossos pacientes. Segundo Han e cols. (1998) as alterações radiológicas características de IVAI por Ad descritas na literatura são hiperinsuflação, espessamento da parede brônquica e áreas desiguais de opacificação. A principal alteração encontrada por Reina e cols. (2004) foi a hiperinsuflação, em 17% dos pacientes, seguida de “imagens compatíveis com pneumonia” em 16% dos casos. No estudo conduzido por Rocholl e cols. (2004) o principal achado foi infiltrado peri-hilar ou atelectasia, em 36% dos casos, seguido de infiltrado focal compatível com pneumonia em 26% dos pacientes. Nos estudos que acompanharam apenas crianças com IVAI, a principal alteração encontrada foi infiltrado difuso ou peri-hilar, em percentuais que variaram entre 85% e 100%, seguida de condensação pulmonar, com percentuais entre 33% e 82%, e atelectasias, entre 15% e 54% (DALMÁS *et al.*, 2003; FARNG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2001). O derrame pleural é a alteração com percentual mais variável, oscilando entre 2% e 64% (CHUANG *et al.*, 2003; DALMÁS *et al.*, 2003; FARNG *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2000; MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998; RIEGER-FACKELDEY; AUMEIER; GENZEL-BOROVICZÉNY, 2000). Nenhum paciente deste estudo apresentou derrame pleural.

O tratamento dos pacientes com IRA por Ad geralmente é baseado em medidas de suporte como reposição de líquidos, nebulização e uso de oxigênio suplementar. Alguns pacientes com IVAI podem necessitar de fisioterapia ou ventilação artificial (HONG *et al.*, 2001). A utilização de broncodilatadores é uma conduta terapêutica relativamente comum, tendo sido relatado seu uso em até 60% dos pacientes com IRA por Ad (REINA *et al.*, 2004). Neste estudo, a utilização de aerossol / salbutamol foi a conduta terapêutica mais aplicada aos pacientes com IRA por Ad (42,1%), embora em percentuais inferiores aos pacientes negativos ou com VSR.

O uso de oxigênio foi pequeno nos pacientes com Ad (7%), bem como em todos os demais grupos de pacientes, sem diferença significativa entre os mesmos. Oxigênio suplementar foi utilizado por 46% dos pacientes em um estudo conduzido por Hong e cols.

(2001). Vários estudos relatam casos de IVAI graves em que houve necessidade de ventilação mecânica (CHUANG *et al.*, 2003; FARNG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2004).

A administração de antibióticos é bastante comum nos pacientes com IRA por Ad, muitas vezes de forma intravenosa. Em diversos estudos o percentual de utilização de antibióticos pelos pacientes com infecção por Ad foi bastante elevada, variando de 46% a 91% (CHEN *et al.*, 2004; CHUANG *et al.*, 2003; REINA *et al.*, 2004; ROCHOLL *et al.*, 2004; STRALIOTTO *et al.*, 2004). A antibioticoterapia em casos de IRA por ad geralmente é iniciada antes do estabelecimento da etiologia e mantida enquanto o paciente apresenta febre e/ou até a condensação pulmonar ser resolvida (HONG *et al.*, 2001). A utilização de antibióticos no tratamento dos pacientes deste estudo também foi elevada, mas mostrou-se semelhante àquela verificada em pacientes infectados por outros vírus ou naqueles negativos para os vírus pesquisados.

Um percentual reduzido de pacientes com Ad precisou fazer uso de corticóides, não havendo diferença com o percentual de pacientes negativos. No entanto, foi significativamente menor que o percentual de pacientes com VSR. O uso de corticosteróides chegou a ser feito em até 40% dos pacientes com IRA por Ad em dois estudos (REINA *et al.*, 2004; STRALIOTTO *et al.*, 2004).

Nos casos graves de infecção disseminada por Ad, além das medidas gerais de suporte, são utilizados esquemas terapêuticos empregando drogas antivirais na tentativa de evitar uma evolução fatal (GAVIN; KATZ, 2002; MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998). Entretanto, nenhum dos agentes antivirais aprovados para uso teve eficácia comprovada para o tratamento dessas infecções graves (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). Em um estudo, o uso de ribavirina intravenosa se mostrou ineficaz no tratamento de doença disseminada, embora tenha sido eficaz em casos de infecção localizada do trato urinário (BORDIGONI *et al.*, 2001). Em outro estudo, o uso de imunoglobulina intravenosa sozinha ou em associação com ribavirina (administrada por inalação, por via intravenosa, ou ambas), ganciclovir ou aciclovir em pacientes com infecção disseminada por Ad levou a uma redução da taxa de mortalidade de 75% para 28% nos pacientes com tratamento antiviral quando comparados aos pacientes que não receberam esse tipo de terapêutica (MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998). Uma droga antiviral que parece promissora para o tratamento de infecções invasivas por Ad é o cidofovir, embora esse agente seja potencialmente nefrotóxico (WALLS; SHANKAR; SHINGADIA, 2003). Nenhum paciente com IRA por Ad deste estudo fez uso de drogas antivirais.

Não foi realizado seguimento dos pacientes neste estudo e, portanto, não foi possível avaliar se algum dos pacientes com IVAI por Ad apresentou seqüelas. Os pacientes que se recuperam de IVAIs graves podem manifestar, anos depois, seqüelas como bronquiolite obliterante, bronquiectasias, síndrome do pulmão hiperlucente unilateral, pulmão persistentemente colapsado e resultados anormais de testes de função pulmonar (HONG *et al.*, 2001). Em um estudo foram comparados dois grupos de pacientes pediátricos com pneumonia, sendo que um dos grupos tinha o Ad como agente etiológico. Os autores do estudo constataram diferença significativa entre os dois grupos com relação ao desenvolvimento de seqüelas. No grupo de pacientes com pneumonia por Ad, cerca de 10% das crianças apresentaram bronquiolite obliterante, e no outro grupo nenhuma complicação permanente ocorreu (FARNG *et al.*, 2002). Em um outro estudo, bronquiolite obliterante foi observada, três meses após a alta hospitalar, em 50% dos pacientes que manifestaram IVAI graves por Ad (CHUANG *et al.*, 2003).

Neste estudo não foi feito acompanhamento da evolução de cada paciente, e, portanto, não foi possível verificar se houve evolução fatal em algum dos casos de infecção por Ad. As taxas de mortalidade devidas a IVAI por Ad relatadas em diversos estudos variam entre 4,2% e 14,8% (CHUANG *et al.*, 2003; DALMÁS *et al.*, 2003; FARNG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2001). Porém, pacientes pediátricos com doença disseminada apresentam taxas de mortalidade bem mais elevadas, chegando a 60% entre pacientes imunocompetentes e a 83% entre pacientes imunodeprimidos (MUNOZ; PIEDRA; DEMMIER, 1998).

6 CONCLUSÕES

O percentual de positividade para vírus respiratórios neste estudo foi de 30,4%, sendo que 1,86% dos casos de IRAs foram causados por Ad, que representaram o quarto vírus mais identificado.

A taxa de isolamento de Ad em cultura celular foi de 78% a partir de amostras positivas para esse vírus por IFI.

Foi criado um banco de cepas de Ad para estudos posteriores sobre diversidade antigênica e genômica desse vírus.

As infecções por Ad foram observadas na maioria dos meses de cada ano de estudo, sempre em número reduzido, sem associação com o período chuvoso ou seco na cidade de Fortaleza.

A maioria das IRAs por Ad foi observada em crianças do sexo masculino e naquelas com até dois anos de idade.

A maioria dos pacientes com IRA por Ad foi atendida em ambulatório e emergência.

O diagnóstico mais freqüente em casos de infecções por Ad foi o de IVAS, representando 70,18% do total de casos.

Os pacientes com IRA por Ad apresentaram mais conjuntivite e exantema que os pacientes infectados por outros vírus e aqueles negativos para os vírus pesquisados no estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, T. H.; BEST, B.; WIGAND, R. A proposal for naming adenovirus genome types, exemplified by adenovirus type 6. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.2685-2691, 1985.

AHN, K. M.; CHUNG, S. H.; CHUNG, E. H.; KOH, Y. J.; NAM, S. Y.; KIM, J. H.; SON, J. A.; PARK, J. Y.; LEE, N. Y.; LEE, S. I. Clinical characteristics of acute viral lower respiratory tract infections in hospitalized children in Seoul, 1996-1998. **J. Korean Med. Sci.**, v.14, p.405-411, 1999.

ALBUQUERQUE, M. C.; SILVA, F. M.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; SANTOS, N. Adenoviruses isolated from civilian and military personnel in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47, p.37-44, 2005.

ARDEN K.E., McERLEAN P., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P., MACKAY, I.M. Frequent detection of human rhinovirus, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. **J. Med. Virol.**, v.78, p.1232-1240, 2006.

ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; McAULIFFE, J. F.; SOUSA, M. A.; MOTA, S. B.; McAULIFFE, M. I.; GEIST, F. C.; CARVALHO, E. P.; FERNANDES, M. C.; GUERRANT, R. L.; GWALTNEY JR, J. M. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, v.164, p.252-258, 1991.

BELL, J. A.; ROWE, W. P.; ENGLER, J. I.; PARROTT, R. H.; HUEBNER, R. J. Pharyngoconjunctival fever: epidemiological studies of a recently recognized disease entity. **J. Am. Med. Assoc.**, v.157, p.1083-1092, 1955.

BEWLEY, M. C.; SPRINGER, K.; ZHANG, Y. B.; FREIMUTH, P.; FLANAGAN, J. M. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. **Science**, v.286, p.1579-1583, 1999.

BORDIGONI, P.; CARRET, A-S.; VANARD, V.; WITZ, F.; LE FAOU, A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1290-1297, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos – 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2005/matriz.htm>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Normas para Controle e Assistência das Infecções Respiratórias Agudas. 3.ed. Brasília, 1993.

BRUNO-LOBO, G.C.; PEREIRA, M. S.; PEREIRA, H.G. Estudos sobre adenovírus no Rio de Janeiro. **Ann. Microbiol.**, v.9, p.567-578, 1961.

CABELLO, C.; MANJARREZ, M. E.; OLVERA, R.; VILLALBA, J.; VALLE, L.; PARAMO, I. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.21-24, 2006.

CARBALLAL, G.; VIDELA, C. M.; ESPINOSA, M. A.; SAVY, V.; UEZ, O.; SEQUEIRA, M. D.; KNEZ, V.; REQUEIJO, P. V.; POSSE, C. R.; MICELI, I. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. **J. Med. Virol.**, v.64, p.167-174, 2001.

- CARRIGAN, D. R. Adenovirus infections in immunocompromised patients. **Am. J. Med.**, v.102, p.71-74, 1997.
- CARVALHO, R. P. S. Contribuição para o estudo dos Adenovírus. **Folia Clin. & Biol.**, v.29, p. 28-64, 1960.
- CASHAT-CRUZ, M.; MORALES-AGUIRRE, J. J.; MENDOZA-AZPIRI, M. Respiratory tract infections in children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v.16, p.84-92, 2005.
- CHEN, H. L.; CHIOU, S. S.; HSIAO, H. P.; KE, G. M.; LIN, Y. C.; LIN, K. H.; JONG, Y. J. Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in southern Taiwan in 2001-2002. **J. Trop. Pediatr.**, v.50, p.279-284, 2004.
- CHEW, F. T.; DORAISINGHAM, S.; LING, A. E.; KUMARASINGHE, G.; LEE, B. W. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. **Epidemiol. Infect.**, v.121, p.121-128, 1998.
- CHUANG, Y. Y.; CHIU, C. H.; WONG, K. S.; HUANG, J. G.; HUANG, Y. C.; CHANG, L. Y.; LIN, T. Y. Severe adenovirus infection in children. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.36, p.37-40, 2003.
- COLLIER, L. Upper respiratory tract and eye infections due to adenoviruses, coronaviruses, and rhinoviruses. In: _____. **Human Virology**, 2.ed, Oxford University Press, 2000. p.69-74.
- COSTA, L.F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O. C.; OLIVEIRA, T. F. M.; SILVEIRA, H. L.; NEPOMUCENO, L. L.; MOREIRA, L. S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L. M. G.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO, L. Z. G.; QUEIRÓZ, D. A. O. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.301-306, 2006.
- CROWE JR., J. E.; WILLIAMS, J. V. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. **Paediatr. Respir. Rev.**, v.4, p.112-119, 2003.
- CRUZ, M. E. M.; ZAIDAN, A. M. E.; RODRIGUES, M. M. L.; DE SÁ, J. P. O.; SILVA, N. M.; OLIVEIRA, J. F. Incidence of influenza A and B viruses among the population of Maceió-AL, Brazil. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 31, p. 9-11, 1999.
- CUSACK, S. Adenovirus complex structures. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.15, p.237-243, 2005.
- DALMÁS, S.; PEREYRA, M. L.; PIREZ, M. C.; MATEOS, S.; VARELA, A.; CHIPARELLI, H.; MONTANO, A.; FERRARI, A. M. Infección respiratoria aguda baja por adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años. **Arch. Pediatr. Urug.**, v.74, p.15-21, 2003.
- D'ANGELO, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; KEENLYSIDE, R. A.; ANDERSON, L. J.; MARTONE, W. J. Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. **J. Infect. Dis.**, v.140, p.42-47, 1979.

DINIZ, E.M.; VIEIRA, R.A.; CECCON, M.E.J.; ISHIDA, M.A.; VAZ, F.A.C. Incidence of respiratory viruses in preterm infants submitted to mechanical ventilation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.45, p.233-236, 2003.

DOMINGUEZ, O.; ROJO, P.; de las HERAS, S.; FOLGUEIRA, D.; CONTRERAS, J. R. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.24, p.733-734, 2005.

ELNIFRO, E. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E.; BAILEY, A. S. PCR and restriction endonuclease analysis for rapid identification of human adenovirus subgenera. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.2055-2061, 2000.

ELNIFRO, E.M., COOPER, R.J., DADY, I., HANY, S., MUGHAL, Z.M., KLAPPER P.E. Three nonfatal cases of neonatal adenovirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.5814-5815, 2005.

FAÇANHA, M. C. Impacto da vacinação de maiores de 60 anos para influenza sobre as internações e óbitos por doenças respiratórias e circulatórias em Fortaleza – CE – Brasil. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, p. 415-420, 2005.

FADEN, H.; WYNN, R. J.; CAMPAGNA, L.; RYAN, R. M. Outbreak of adenovirus type 30 in a neonatal intensive care unit. **J. Pediatr.**, v.146, p523-527, 2005.

FARNG, K. T.; WU, K. G.; LEE, Y. S.; LIN, Y. H.; HWANG, B. T. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.35, p.37-41, 2002.

FÉ, M. M. M. Análise do perfil clínico-epidemiológico das infecções respiratórias agudas causadas por vírus parainfluenza em crianças atendidas em hospital de referência da cidade de Fortaleza. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2007.

FLOMENBERG, P.; BABBITT, J.; DROBYSKI, W. R.; ASH, R. C.; CARRIGAN, D. R.; SEDMAK, G. V.; MCAULIFFE, T.; CAMITTA, B.; BUNIN, N. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. **J. Infect. Dis.**, v.169, p.775-781, 1994.

FUSCHIOTTI, P.; SCHOEHN, G.; FENDER, P.; FABRY, C. M. S.; HEWAT, E. A.; CHROBOCZEK, J.; RUIGROK, R. W. H.; CONWAY, J. F. Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. **J. Mol. Biol.**, v.356, p.510-520, 2006.

GAVIN, P. J.; KATZ, B. Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. **Pediatrics.**, v.110, p.e9, 2002.

GINSBERG, H.S. The life and times of adenoviruses. **Adv. Virus Res.**, v.54, p.1-13, 1999.

GOMES, S. A.; GABBAY, Y. B.; NASCIMENTO, J. P.; NIEL, C. Genome analysis of adenovirus 4a, a causative agent of pharyngoconjunctival fever and respiratory diseases in Brazil. **J. Med. Virol.**, v.26, p.453-459, 1988.

HAN, B. K.; SON, J. A.; YOON, H. K.; LEE, S. I. Epidemic adenoviral lower respiratory tract infection in pediatric patients: radiographic and clinical characteristics. **Am. J. Roentgenol.**, v.170, p.1077-1080, 1998.

HARLEY, D.; HARROWER, B.; LYON, M.; DICK, A. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. **Commun. Dis. Intell.**, v.25, p.9-12, 2001.

HATHERILL, M.; LEVIN, M.; LAWRENSON, J.; HSIAO, N-Y.; REYNOLDS, L.; ARGENT, A. Evolution of an adenovirus outbreak in a multidisciplinary children's hospital. **J. Paediatr. Child Health**, v.40, p.449-454, 2004.

HIJAZI, Z.; PACSA, A.; EISA, S.; SHAZLI, A.; EL-SALAM, R. A. Laboratory diagnosis of acute lower respiratory tract viral infections in children. **J. Trop. Pediatr.**, v.42, p.276-280, 1996.

HOGG, J. C. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.160, p.s26-s28, 1999.

HONG, J. Y.; LEE, H. J.; PIEDRA, P. A.; CHOI, E. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. Y.; KIM, W. S. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1423-1429, 2001.

HOWELL, M. R.; NANG, R. N.; GAYDOS, C. A.; GAYDOS, J. C. Prevention of adenoviral acute respiratory disease in Army recruits: cost-effectiveness of military vaccination policy. **Am. J. Prev. Med.**, v.14, p.168-175, 1998.

JENNINGS, L. C.; ANDERSON, T. P.; WERNO, A. M.; BEYNON, K. A.; MURDOCH, D. R. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.23, p.1003-1007, 2004.

JUVÉN, T.; MERTSOLA, J.; WARIS, M.; LEINONEN, M.; MEURMAN, O.; ROIVAINEN, M.; ESKOLA, J.; SAIKKU, P.; RUUSKANEN, O. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.19, p.293-298, 2000.

KAJON, A. Molecular epidemiological studies of adenoviruses associated with severe and fatal respiratory infections of children in the south cone of South America. Tese (doutorado). Umea University, Sweden, 1995.

KAJON, A. E.; PORTES, S. A. R.; MELLO, W. A.; NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M. Genome type analysis of Brazilian adenovirus strains of serotypes 1, 2, 3, 5 and 7 collected between 1976 and 1995. **J. Med. Virol.**, v.58, p.408-412, 1999.

KIM, C. K.; KIM, S. W.; KIM, J. S.; KOH, Y. Y.; COHEN, A. H.; DETERDING, R. R.; WHITE, C. W. Bronchiolitis obliterans in the 1990s in Korea and the United States. **Chest**, v.120, p.1101-1106, 2001.

KIM, M.R.; LEE, H.R.; LEE, G.M. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. **J. Infect.**, v.41, p.152-158, 2000.

KIM, Y. J.; HONG, J. Y.; LEE, H. J.; SHIN, S. H.; KIM, Y. K.; INADA, T.; HASHIDO, M.; PIEDRA, P. A. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.4594-4599, 2003.

KLIG, J.E. Lower respiratory infections in children. **Curr. Opin. Pediatr.**, v.14, p.116-120, 2002.

KUSEL, M. M. H.; KLERK, N. H.; HOLT, P. G.; KEBADZE, T.; JOHNSTON, S. L.; SLY, P. D. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life. A birth cohort study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.25, p.680-686, 2006.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; FERRENBURG, J.; HUANG, M.L.; CENT, A.; COREY, L.; MORROW, R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.2382-2388, 2006.

LAGOS, R.; AVENDAÑO, L. F.; LEVINE, M. M. Vigilancia sistemática de virus influenza, respiratorio sincicial, parainfluenza y adenovirus, en niños ambulatorios con infecciones respiratorias agudas. **Rev. Méd. Chile**, v.127, p.1063-1072, 1999.

LARCHER, C.; JELLER, V.; FISCHER, H.; HUEMER, H. P. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalised children in Austria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.25, p.682-686, 2006.

LARRAÑAGA, C.; KAJON, A.; VILLAGRA, E.; AVENDAÑO, L. F. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). **J. Med. Virol.**, v.60, p.342-346, 2000.

LEGG, J. P.; WARNER, J. A.; JOHNSTON, S. L.; WARNER, J. O. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.24, p.611-616, 2005.

LI, Q. G.; WADELL, G. Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. **J. Virol.**, v.60, p.331-335, 1986.

LIN, T. Y.; HUANG, Y. C.; NING, H. C.; TSAO, K. C. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. **J. Clin. Virol.**, v.30, p.81-85, 2004.

MARTINS, M. G. Perfil epidemiológico das infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus influenza em crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza-CE (2001-2004). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MINNICH, L.; RAY, C. G. Comparison of direct immunofluorescent staining of clinical specimens for respiratory virus antigens with conventional isolation techniques. **J. Clin. Microbiol.**, v.12, p.391-394, 1980.

MITCHELL, L. S.; TAYLOR, B.; REIMELS, W.; BARRETT, F. F.; DEVINCENZO, J. P. Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. **Pediatr Infect. Dis. J.**, v.19, p.996-1000, 2000.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v.75, p.334-344, 1999.

MORAES, M. T.; LEITE, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; KRAWCZUK, M. M.; NASCIMENTO, J. P. Genomic characterization of adenovirus serotype 7 isolated in Brazil from acute respiratory disease patients during the period from 1980 to 1991. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, p.185-189, 1997.

MORAES, M. T.; SILVA, M.; LEITE, J. P.; NASCIMENTO, J. P. Genetic and antigenic analysis of adenovirus type 3 strains showing intermediate behavior in standard seroneutralization test. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.231-235, 1998.

MORFIN, F.; DUPUIS-GIROD, S.; MUNDWEILER, S.; FALCON, D.; CARRINGTON, D.; SEDLACEK, P.; BIERINGS, M.; CETKOVSKY, P.; KROES, A. C.; van TOL, M. J.; THOUVENOT, D. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. **Antivir. Ther.**, v.10, p.225-229, 2005.

MOURA, F. E. A. Infecções respiratórias agudas virais em crianças de Salvador: caracterização antigênica e genômica dos vírus sincicial respiratório e adenovírus isolados e correlação clínico-epidemiológica. Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A. R.; RAMOS, E. A. G.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, p.739-743, 2003.

MOURA, F. E. A.; NUNES, I. F. S.; SILVA JR, G. B.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infections in Northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.74, p.165-167, 2006.

MOURA, F. E. A.; RIBEIRO, D. H.; BORGES, L. C.; RAMOS, E. A. G. Diagnóstico laboratorial de infecções respiratórias agudas de etiologia viral: uma opção diagnóstica disponível para clínicos no Nordeste do Brasil. **Pediatr. Mod.**, v.38, p.255-260, 2002.

MOURA, P. O.; ROBERTO, A. F.; HEIN, N.; BALDACCI, E.; VIEIRA, S. E.; EJZENBERG, B.; FERRINI, P.; STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; MEHNERT, D. U.; HÁRSI, C. M. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. **J. Med. Virol.**, v.79, p.174-181, 2007.

MUNOZ, F. M.; PIEDRA, P. A.; DEMMIER, G. J. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. **Clin. Infect. Dis.**, v.27, p.1194-1200, 1998.

MURTAGH, P.; KAJON, A. Chronic pulmonary sequelae of adenovirus infection. **Pediatr. Pulmonol.**, v.16, p.s150-s151, 1997. Suplemento.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARIAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory

diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, p.287-296, 1991.

NAJIOULLAH, F.; GUERRAZ, F.T.; THOUVENOT, D.; MILON, M.P.; LACHAUX, A.; FLORET, D. Infections nosocomiales à adenovirus dans un service de pediatrie. **Pathologie Biologie**, v.52, p.16-20, 2004.

NUNES, I. F.; MOURA, F. E. A. Isolation of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates stored at 20 degrees C from one to fifteen months after collection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.451-453, 2006.

O'DONNELL, B.; BELL, E.; PAYNE, S. B.; MAUTNER, V.; DESSELBERGER, U. Genome analysis of species 3 adenoviruses isolated during summer outbreaks of conjunctivitis and pharyngoconjunctival fever in the Glasgow and London areas in 1981. **J. Med. Virol.**, v.18, p.213-227, 1986.

OLIVEIRA, J. F.; SÁ, J. P. O.; CRUZ, M. E. M. Influenza virus A and B identification and monitoring in the population of Maceió. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.9, p.241-246, 2004.

ORDÁS, J.; BOGA, J. A.; ALVAREZ-ARGÜELLES, M.; VILLA, L.; RODRÍGUEZ-DEHLI, C.; OÑA, M.; RODRÍGUEZ, J.; MELÓN, S. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.2739-2742, 2006.

ORSTAVIK, I.; GRANDIEN, M.; HALONEN, P.; ARSTILA, P.; MORDHORST, C. H.; HORNSLETH, A.; POPOW-KRAUPP, T.; MCQUILLIN, J.; GARDNER, P. S.; ALMEIDA, J. Viral diagnosis using the rapid immunofluorescence technique and epidemiological implications of acute respiratory infections among children in different European countries. **Bull. World Health Organ.**, v.62, p.307-313, 1984.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. PAHO Publishing: Child Health. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

PERCIVALLE, E.; SARASINI, A.; TORSELLINI, M.; BRUSCHI, L.; ANTONIAZZI, E.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. A comparison of methods for detecting adenovirus type 8 keratoconjunctivitis during a nosocomial outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. **J. Clin. Virol.**, v.28, p.257-264, 2003.

PORTES, S. A. R.; SILVA, E. E.; SIQUEIRA, M. M.; FILIPPIS, A. M. B.; KRAWCZUK, M. M.; NASCIMENTO, J. P. Enteroviruses isolated from patients with acute respiratory infections during seven years in Rio de Janeiro (1985-1991). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.40, p.337-342, 1998.

PORTILLO, C. M.; CRUZ, J. Implementación del método rápido de diagnóstico de virus por inmunofluorescencia en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas. **Rev. Chil. Pediatr.**, v.71, p.72-77, 2000.

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

- RÁCZ, M.L. Adenovirus. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4.ed. Atheneu, 2004. p. 587-590.
- RAJAIYA, J.; CHODOSH, J. New paradigms in infectious eye disease: adenoviral keratoconjunctivitis. **Arch. Soc. Esp. Oftalmol.**, v.81, p.493-498, 2006.
- RAY, C. G.; MINNICH, L. L. Viruses, rickettsia, and chlamydia. In: HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 18.ed. W. B. Saunders Company, 1991. p.1218-1263.
- REGEV, L.; HINDIYEH, M.; SHULMAN, L. M.; BARAK, A.; LEVY, V.; AZAR, R.; SHALEV, Y.; GROSSMAN, Z.; MENDELSON, E. Characterization of human metapneumovirus infections in Israel. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.1484-1489, 2006.
- REINA, J.; FERRES, F.; GUTIÉRREZ, O.; GOPEGUI, E. R.; GONZÁLEZ-CÁRDENAS, M. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). **An. Pediatr. (Barc.)**, v.61, p.137-142, 2004.
- RIEGER-FACKELDEY, E.; AUMEIER, S.; GENZEL-BOROVICZÉNY, O. Disseminated adenovirus infection in two premature infants. **Infection**, v.28, p.237-239, 2000.
- ROCHOLL, C.; GERBER, K.; DALY, J.; PAVIA, A. T.; BYINGTON, C. L. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. **Pediatrics**, v.113, p.e51-e56, 2004.
- RODRIGUES, O.G.; ROZOV, T.; DA SILVA, E.M.K.; KOPELMAN, B.I. Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um Centro de Saúde Escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v.26, p.13-20, 2004.
- RUSSELL, K. L.; HAWKSWORTH, A. W.; RYAN, M. A.; STRICKLER, J.; IRVINE, M.; HANSEN, C. J.; GRAY, G. C.; GAYDOS, J. C. Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. **Vaccine**, v.24, p.2835-2842, 2006.
- RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.2573-2604, 2000.
- RUUSKANEN, O.; MEURMAN, O.; AKUSJÄRVI, G. Adenoviruses. In: RICHMAN, D. D. **Clinical Virology**. Churchill Livingstone, 1997. p.525-547.
- SARANTIS, H.; JOHNSON, G.; BROWN, M.; PETRIC, M.; TELLIER, R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.3963-3969, 2004.
- SHEK, L. P. C.; LEE, B. W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatr. Respir. Rev.**, v.4, p.105-111, 2003.
- SHENK, T. *Adenoviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fundamental Virology**. 3.ed. Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.979-1016.

SHETTY, A. K.; TREYNOR, E.; HILL, D. W.; GUTIERREZ, K. M.; WARFORD, A.; BARON, E. J. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.22, p.789-794, 2003.

SHING-NAZ, N.; BROWN, M.; GANESSHANANTHAN, M. Nosocomial adenovirus infection: molecular epidemiology of an outbreak. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.12, p.922-925, 1993.

SIQUEIRA, M. M.; FERREIRA, V.; NASCIMENTO, J. P. RS virus diagnosis: comparison of isolation, immunofluorescence and enzyme immunoassay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.81, p.225-232, 1986.

SONODA, S.; GOTOH, Y.; BANN, F.; NAKAYAMA, T. Acute lower respiratory infections in hospitalized children over a 6 year period in Tokyo. **Pediatrics International**, v.41, p.519-524, 1999.

SOUZA, L. S. F.; RAMOS, E. A. G.; CARVALHO, F. M.; GUEDES, V. M. C. R.; SOUZA, L. S.; ROCHA, C. M.; SOARES, A. B.; VELLOSO, L. F.; MACEDO, I. S.; MOURA, F. E. A.; SIQUEIRA, M.; FORTES, S.; JESUS, C. C.; SANTIAGO, C. M. G.; CARVALHO, A. M. S.; ARRUDA, E. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatr. Pulmonol.**, v.35, p.184-191, 2003.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B.; CUNHA, M. L. T.; NESTOR, S. M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.283-291, 2002.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MACHADO, V.; MAIA, T. M. R. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.883-7, 2004.

SUTMOLLER, F.; MAIA, P. R. Acute respiratory infections in children living in two low income communities of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.90, p.665-674, 1995.

TEPER, A. M.; KOFMAN, C. D.; MAFFEY, A. F.; VIDAURRETA, S. M. Lung function in infants with chronic pulmonary disease after severe adenoviral illness. **J. Pediatr.**, v.134, p.730-733, 1999.

TSUCHIYA, L. R. R. V.; COSTA, L. M. D.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R. A.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **J. Infect.**, v.51, p.401-407, 2005.

TSAI, H. P.; KUO, P. H.; LIU, C. C.; WANG, J. R. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.111-118, 2001.

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

WALLS, T.; SHANKAR, A. G.; SHINGADIA, D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. **Lancet Infect. Dis.**, v.3, p.79-86, 2003.

WESSELS, M. R. Streptococcal and enterococcal infections. In: FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K. J.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; KASPER, D.L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D.L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 14. ed. McGraw-Hill Companies, Inc., 1998. p.885-892.

XU, W.; McDONOUGH, M. C.; ERDMAN, D. D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.4114-4120, 2000.

ANEXOS

ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS INFANTIS EM FORTALEZA.

Estamos fazendo uma pesquisa para conhecer as características das viroses respiratórias em crianças com doenças respiratórias agudas (gripe, bronquite, pneumonia ou outras doenças semelhantes), atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin. Essas viroses causam, todos os anos, doença em um grande número de crianças e adultos, e esta pesquisa busca saber mais sobre essas doenças, para tentar ajudar nas medidas de controle, como vacinações ou tratamentos. Para isso, estamos pedindo sua colaboração.

Neste estudo, colhemos o material para exame pela aspiração de uma pequena quantidade de secreção através das narinas da criança, e preenchemos uma ficha com as informações dadas pela mãe ou pelo responsável pela criança, e pelo médico que a atendeu. A mãe ou responsável fica na sala durante a coleta. Esse procedimento geralmente não dói, mas pode causar desconforto à criança, e ela pode chorar durante a coleta. Raramente, pode ocorrer aspiração de secreção com sangue por pequeno trauma (machucado) na mucosa nasal.

O responsável pela criança ou o médico que a atendeu poderão ter acesso ao resultado do exame.

Em caso de dúvida ou solicitação do resultado, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Dr. Jacó Ricarte Lima de Mesquita, telefone nº 9997-2516 ou 4009-8303.

Esclarecemos que a participação neste estudo é voluntária (ninguém é obrigado a participar), e que a pessoa pode desistir de participar a qualquer momento, sem prejudicar o atendimento no hospital. As informações obtidas na pesquisa são confidenciais, e só serão divulgadas em eventos e publicações científicas da área da saúde, sem dizer o nome dos pacientes.

Eu, _____, declaro que, após ter sido esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em deixar o menor de idade _____ participar deste protocolo de pesquisa, sendo eu o seu responsável legal.

Fortaleza, _____ de _____ de 200__

Assinatura do Responsável pela Criança

Pesquisador: Jacó Ricarte Lima de Mesquita – Rua Cel. Alves Teixeira, 1130, ap. 103

Tel. 3246 2747 – End. Eletrônico: jacomesquita@hotmail.com

Orientadora: Dra. Fernanda Edna Araújo Moura – Tel. 3279 2297 – End. Eletrônico:

fernandaedna@terra.com.br

(1ª via: pesquisador; 2ª via: paciente)

ANEXO II – Ficha epidemiológica

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS INFANTIS EM FORTALEZA.

DADOS PESSOAIS

Nome do Paciente: _____ Idade: _____

Bairro: _____ Telefone: _____ Pessoa p/ Contato: _____

Sexo: Feminino () Masculino ()

PROCEDÊNCIA

Ambulatório () Emergência () Observação () UTI () Enfermaria ()

Prontuário: _____ Leito: _____ Bloco: _____

ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS

Renda Familiar: _____ Pai e Mãe Empregados () Pai e Mãe Desempregados ()

Pai ou Mãe Empregados ()

Escolaridade do Pai _____ Mãe: _____

Quantas Pessoas Moram em Casa: _____ Nº de Cômodos: _____

Frequente Creche/Escola: Sim () Não () Quantas Horas por Dia: _____

HISTÓRICO DO PACIENTE

Parto Normal () Cesárea () Fórceps () A Termo () Prematuro ()

Não Mamou () Mamou < 6 Meses () Mamou > 6 meses () Ainda Mama ()

Vacinação: Em Dia () Atrasada ()

1ª Vez que Cansa: Sim () Não () Idade que Cansou a 1ª Vez: _____

Internação Anterior por Problema Respiratório: Sim () Não () Nº de Vezes: _____

Gripa Frequentemente: Sim () Não () Nos Últimos Dois Meses: 1-2x () 3-5x () >5x ()

A criança está faltando aula pela doença atual? Sim () Não () No de dias: _____

Ausência no trabalho pela doença atual? Sim () Não () No de dias: _____

HISTÓRICO FAMILIAR

História de Cansaço na Família: Mãe () Pai () Irmãos () Primos () Tios () Avós ()

Outro Familiar com Infecção: Sim () Não () Quem: _____

Fumantes em Casa: Sim () Não () Quem: _____

EXAME FÍSICO E ASPECTOS CLÍNICOS

Peso: _____ Temperatura: _____ FR: _____

Queixa Principal: _____

Tempo de Início dos Sintomas: _____

Coriza () Obstrução Nasal () Espirros () Tosse Cheia () Tosse Seca ()

Dispnéia () Febre () Conjuntivite () Otite () Dor de Garganta () Dor de Cabeça ()

Gemente () Rouquidão () Anorexia () Vômitos () Diarréia () Cianose ()

Convulsões () Estridor () Exantema ()

Doenças Associadas: Sim () Não () Qual: _____

Ausulta Pulmonar: Riscos () Sibilos () Estertores ()

Tiragem Intercostal () Tiragem Supraesternal () Batimentos de Asa do Nariz ()

EXAMES REALIZADOS

Raio-X de Tórax: Sim () Não ()

Data	Resultado – Achados Radiológicos
	Normal() Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsuflação () Outros: _____
	Normal() Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsuflação () Outros: _____
	Normal() Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsuflação () Outros: _____

Hemograma

Data	Ht	Hb	Leuc.	Segm.	Linfoc.	Linf. Atípicos	Basóf.	Eosin.	Monóc.	Plaq.

Gasometria

Data	pH	PCO ₂	PO ₂	Sat. O ₂			

Hemocultura: Sim () Não () Negativa () Positiva ()

Bactéria Isolada: _____

Antibiograma: Resistente: _____

Sensível: _____

TRATAMENTO INSTITUÍDO PELO MÉDICO

Antitérmico () Antibiótico () Aerossol () Salbutamol () Corticóide () Sorine ()

Cateter de O₂ () Oxi-Hood () Ventilação Mecânica () Adrenalina ()

Outros: _____

	Especificação	Início	Término	Nº Total de Dias	
	Antibiótico 1				
	Antibiótico 2				
	Antibiótico 3				

Outros: _____

Data Admissão: _____ Data Alta: _____ Dias internação: _____

Óbito: Sim () Não ()

IMPRESSÃO

DIAGNÓSTICA _____

ANEXO III – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
FoneFax: (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 IV – SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS

1. SOLUÇÃO DE PBS 10X CONCENTRADA

NaCl.....	80g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	21g
KCl.....	2g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Ajustar o pH para 7,2. Esterilizar por autoclavação. Para uso, diluir esta solução 1/10 em água destilada estéril.

2. SOLUÇÃO DE TRIPSINA A 2,5g/L (Sigma)

3. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO A 0,9% (Farmace)

4. SORO BOVINO FETAL (SBF) inativado, estéril, isento de *Mycoplasma* (Cultilab)

5. MEIO ESSENCIAL MÍNIMO COM SAIS DE EARLE (MEM-E)

MEM (Gibco) com sais de Earle, sem L-glutamina, sem bicarbonato de sódio.....	9,4g
Água Milli-Q q.s.p	1000mL
L-glutamina a 2% (Gibco), pH 7,3.....	10mL
Solução de penicilina-estreptomicina (Gibco), 10000U/mL de penicilina G sódica e 10000µg/mL de sulfato de estreptomicina.....	10mL
Bicarbonato de sódio PA (Dinâmica) a 7,5%, estéril.....	29,3mL

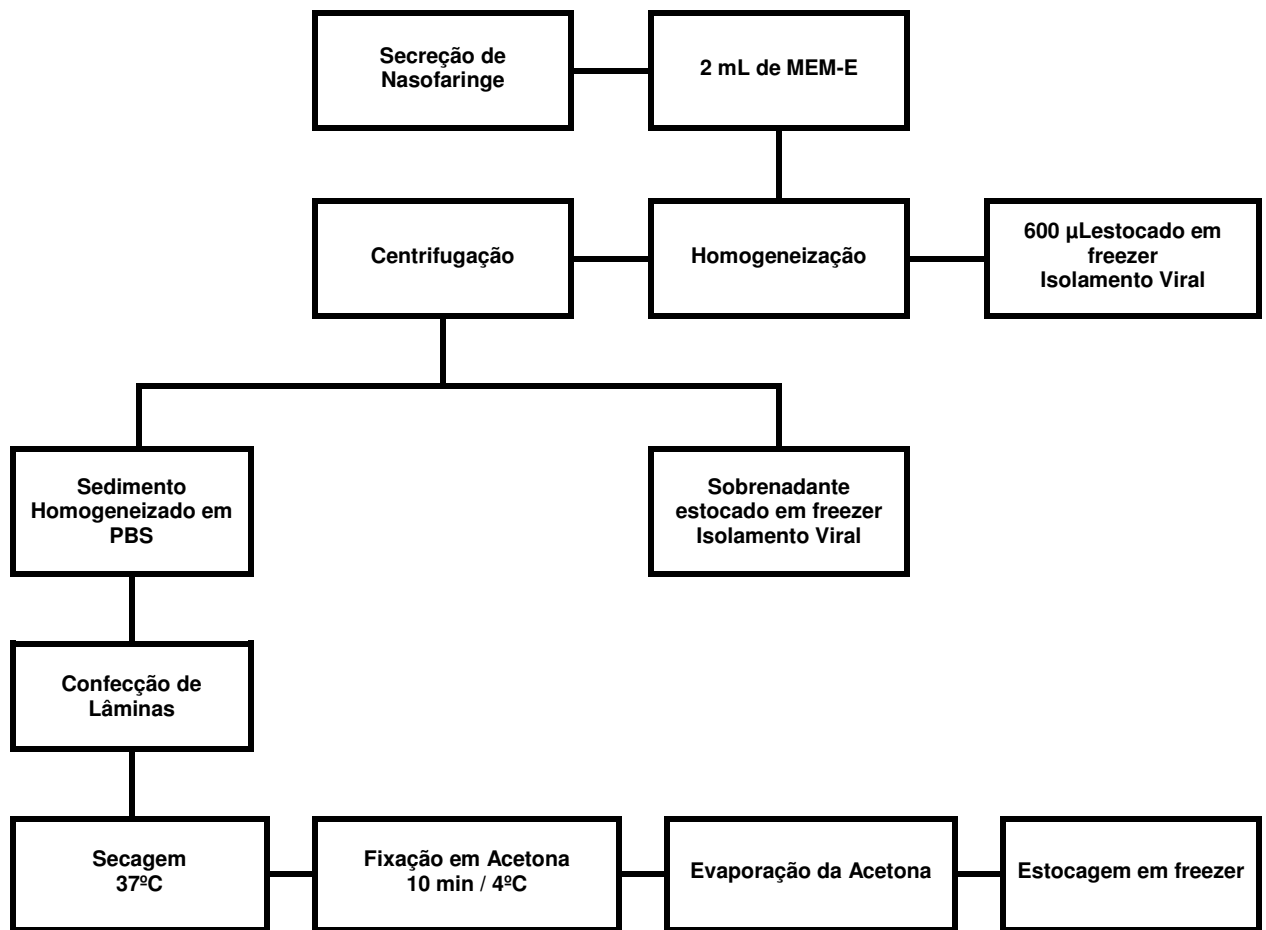
Dissolver o MEM-E em 950,7mL de água Milli-Q e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, adicionar asépticamente a glutamina, a penicilina-estreptomicina e o bicarbonato de sódio.

6. MEIO DE CONGELAMENTO

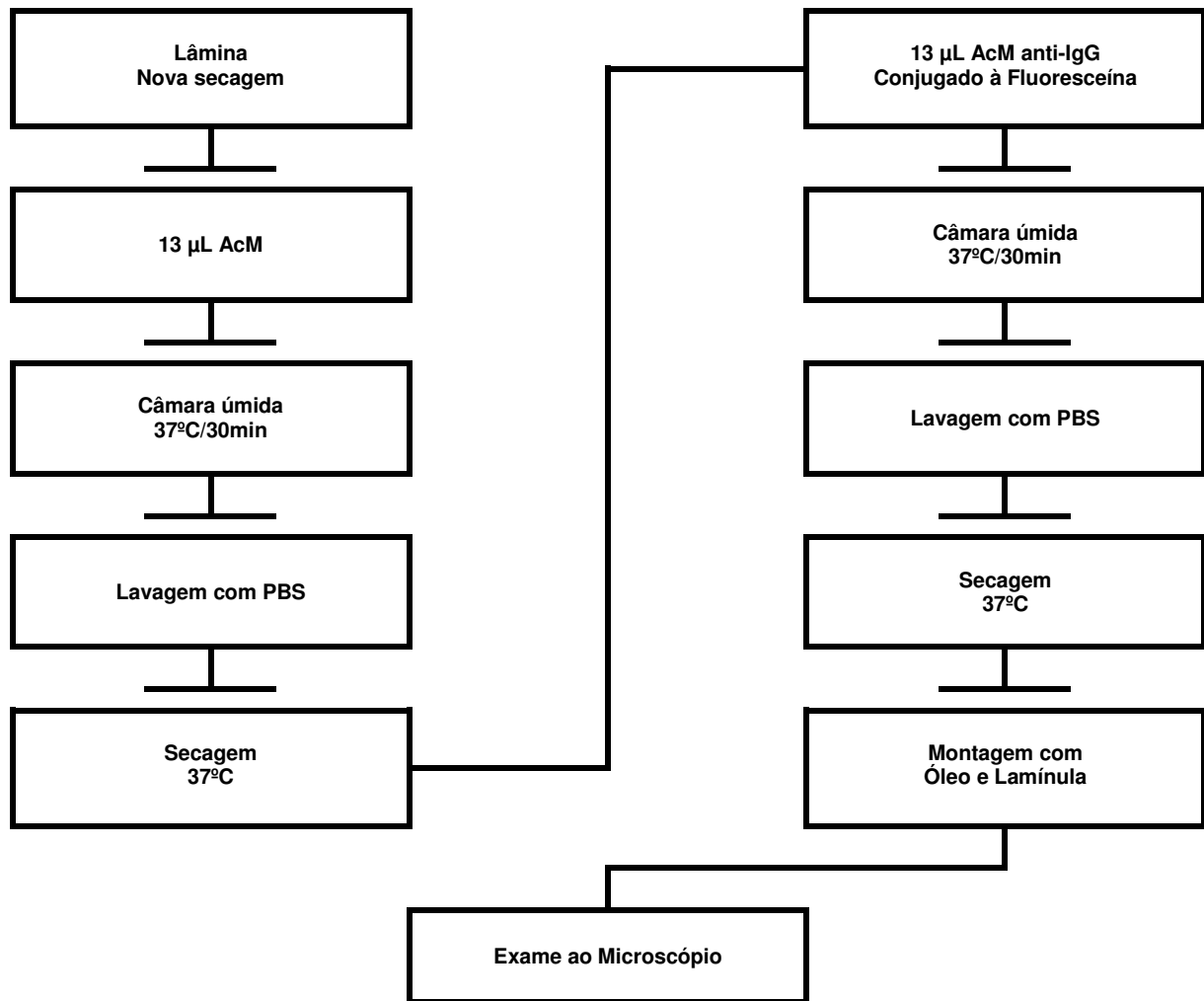
SBF.....	200 mL
Glicerol (Sigma).....	100mL
MEM-E q.s.p.....	1000mL

Misturar as soluções.

ANEXO V – FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS



ANEXO VI – FLUXOGRAMA DA TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA



ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

Adenoviral Respiratory Infections in Children of Urban Northeast Brazil

Fernanda EA Moura¹, Jacó RL Mesquita¹, Manoel DC Silva¹, André J Monteiro²

1. Laboratório de Virologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado S/N- Rodolfo Teófilo- 60441-750, Fortaleza, CE, Brasil. 2. Departamento de Estatística, Universidade Federal do Ceará.

Adenovirus (Ad) is an important etiologic agent of acute respiratory infections (ARI) in children. This report describes the clinical and epidemiologic characteristics of these infections in children attended in an important pediatric hospital of the city of Fortaleza. From January 2001 to December 2006, 3,070 samples of nasopharyngeal aspirates were obtained, and Ad were detected in 1.86% of them. Ad was identified throughout the year without a particular seasonality. There was no correlation with rainy season. Most Ad infections (63.15%) occurred in children aged seven to 24 months. Most samples (50.9%) of Ad patients were obtained from those attended in the out-patient facility. Most Ad patients (70.18%) had upper respiratory tract infections (URTI). The main symptoms and signs presented by Ad patients were fever (91.23%), cough (85.96%), rhinorrhea (82.14%), anorexia (51.97%), and vomiting or diarrhea (51.79%). However, there was no great difference between these percentages and those presented by all patients with ARI. Conjunctivitis and rash were found in Ad patients in higher percentages than in other groups of patients.

Key words: acute respiratory infections – adenovirus – children

INTRODUCTION

Adenovirus (Ad) is responsible for a broad spectrum of diseases in children ranging from mild or even asymptomatic infections to those that are severe and sometimes fatal. The most common manifestations resulting from adenovirus infection involve the respiratory and gastrointestinal tracts, but cardiac, neurological, cutaneous, urinary, and lymphatic

manifestations also occur. Ad acute respiratory infections (ARI) occur worldwide in the form of epidemic, endemic, or sporadic disease, causing 2 to 7% of respiratory tract infections in children in the first 5 years of life (Farnig *et al.* 2002). Ad has been implicated in 5 to 11% of upper respiratory tract infection, 4 to 10% of pharyngitis, 3 to 9% of croup, 5 to 11% of bronchitis, 2 to 10% of bronchiolitis and 4 to 10% of pneumonias (Mitchell *et al.* 2000). In general, Ad respiratory infections do not occur in a particular seasonal pattern. The virus is detected throughout the year, but outbreaks may occur in winter and spring (Kim *et al.* 2000, Tsai *et al.* 2001, Costa *et al.* 2006).

Ad may be identified in the laboratory by inoculating a variety of cell cultures with respiratory secretions collected from the patients. Although this method is still the gold standard for Ad diagnosis, virus culture takes several days to complete (Takimoto *et al.* 1991). So, most clinical virology laboratories perform rapid diagnostic procedures for the direct detection of respiratory viral antigens in clinical specimens. These methods include immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays (Shetty *et al.* 2003). Immunofluorescence assay is rapid and cheap and it is able to screen several different viruses in the same clinical sample (Shen *et al.* 1996). More recently, PCR technology has allowed Ad identification in the patient specimen and further serotype determination through the analysis of the nucleotide sequence (Sarantis *et al.* 2004).

Until now, no report about the epidemiology of adenoviral ARI had been conducted in the city of Fortaleza. In this retrospective study, our main objective was to describe the clinical and epidemiologic characteristics of adenovirus respiratory tract infections in patients attended in a pediatric reference hospital in Fortaleza, Brazil, during the period from January 2001 through December 2006.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was performed in the city of Fortaleza, capital of the state of Ceará, Northeast Brazil. Fortaleza is a city with approximately 2.1 million inhabitants, located 4° south of the equator at sea level and has a tropical climate with mean relative humidity of 77% and mean annual temperature of 27°C.

Patients

The study population included 3,070 children attended in the out-patient facility, emergency room and in-patient wards of Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) who presented with symptoms of ARI, as described by Moura *et al* (2003), during the period from January 2001 through December 2006. Demographic, epidemiologic and clinical data were obtained at the moment of the sample collection. Written consent was obtained from the children's parents. The study was approved by the Ethics Committee of HIAS.

Specimens

Nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected from patients within seven days of the onset of the symptoms and transported on ice to the virology laboratory at Departamento de Patologia e Medicina Legal of the Universidade Federal do Ceará.

Viral antigen detection

Indirect immunofluorescence assay (IFA) was done directly on all the 3,070 nasopharyngeal aspirates by using commercially available monoclonal antibodies (Chemicon) against respiratory syncytial virus (RSV), influenza A and B (FLU A/B), parainfluenzaviruses 1 to 3 (PIV 1-3), and Ad, following the manufacturer's instructions.

Virus culture

Forty one Ad positive samples by IFA and 103 negative ones were inoculated into HEp-2 cell monolayers as described previously (Moura, 2001). Briefly, the cells were grown in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) containing 10% of fetal bovine serum (FBS),

10.000 U/mL peniciline, 10.000µg/mL gentamicine, 2% L-glutamine, and 7.5% sodium bicarbonate. The tubes containing the cells were inoculated with 100µL of NPA. After 30 minutes, MEM containing 2% of FBS was added to the tubes, and they were incubated at 37°C and examined daily for cytopathic effect (CPE) for two weeks. When typical Ad CPE was observed, viral identification was done by immunofluorescence with virus-specific monoclonal antibody (Chemicon).

Statistical analysis

Comparisons between the cases of Ad ARI and the cases of ARI negative to all investigated viruses were performed, as well as between the cases of Ad ARI and those caused by most frequent viruses (RSV and Flu A). The statistical analysis was done by using Student's *t* test, Fisher's exact test, and chi-square test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Of 3,070 samples submitted to IFA, 933 (30.39%) were positive to at least one of the viruses investigated. Ad was detected in 57 patients: from 54 Ad positive samples by IFA, 41 were inoculated into cell culture resulting in 32 (78.05%) viral isolations; among the negative samples inoculated three were positive by this technique. Ad accounted for 6.1% of viral respiratory infections and for 1.86% of total cases of ARI. During the study period Ad was identified throughout the year without a particular seasonality. Figure 1 shows the mensal distribution of Ad ARI in the years of study. There was no correlation with rainy season (figure 2).

Most Ad infections (63.15%) occurred in children aged seven to 24 months (table 1). The mean age of Ad patients was 23 months. To compare the age of Ad patients to the age of patients negative to all viruses investigated, Student's *t* test was applied and no statistically significant diference was found ($p= 0.8836$). The same test was performed to compare the age

of Ad patients to the age of other patients with the most frequent viruses (RSV and Flu A). It was observed that Ad patients were older than RSV patients ($p= 0.0112$), but younger than Flu A patients ($p= 0.0071$).

Males represented 59.65% of Ad positive cases (table 1) with a male-to-female ratio of 1.5 to 1. In the group of patients negative to all viruses investigated this ratio was 1.2 to 1 and the difference between the two groups was not statistically significant ($p= 0.4224$, Fisher's exact test). The same way, there was no statistically significant difference between Ad patients and RSV or Flu A patients regarding this characteristic.

Most Ad patients (50.9%) were attended in the out-patient facility (table 1), in contrast to the negative and RSV patients. Qui-square test was applied and it was found a statistically significant difference between the group of Ad patients and negative patients ($p= 0.0077$), as well as between Ad patients and RSV patients ($p= 0.0000$).

No statistically significant difference was found between the percentages of Ad patients and the percentages of negative patients in regard to the following risk factors and underlying diseases: crowded environment (including living conditions and day care or school attendance), absence of breastfeeding, household exposure to other family members with symptoms of ARI, passive smoking, prematurity, asthma, and cardiopathy. However, in the comparison between Ad patients and RSV and Flu A patients (Fisher's exact test), it was found a higher percentage of passive smoking in the group of RSV patients ($p= 0.0170$) and a lower percentage of patients attending day care in the same group ($p= 0.0192$).

Most Ad patients (70.18%) had upper respiratory tract infections (URTI) (table 1). Among the lower respiratory tract infections (LRTI), pneumonia was the major syndrome diagnosed (17.54%) followed by bronchiolitis (8.77%). These numbers are not far different from those found in negative patients. However, the comparison between Ad patients and those with the most frequent viruses showed a statistically significant difference (Fisher's exact test). Ad patients had more URTI than RSV patients ($p= 0.0000$). In contrast, RSV

patients had more pneumonia ($p= 0.0331$) and more bronchiolitis ($p= 0.0005$) than Ad patients.

Almost all Ad patients (91.23%) presented with fever. Other common symptoms were cough (85.96%), rhinorrhea (82.14%), anorexia (51.97%), and vomiting or diarrhea (51.79%). Nevertheless, there was no great difference between these percentages and those presented by all patients with ARI. Conjunctivitis was seen in 16.36% of Ad patients and only in 3.62% of negative patients, with a statistically significant difference between the two groups ($p= 0.0002$). Rash was present for 5.36% of Ad patients and for 1.17% of negative patients ($p= 0.0332$).

Most Ad patients (60.0%) had normal pulmonary auscultation. This percentage was higher than that of negative patients ($p= 0.0104$) and RSV patients ($p= 0.0000$).

Chest radiographs were taken for 20 of 57 Ad patients and 60.0% of them had any kind of alteration. Interstitial infiltration was seen in 35.0%, consolidation in 20.0%, and hyperaeration in 5.0%. There was no statistically significant difference between these percentages and those of negative patients, however, RSV patients had higher percentages of hyperaeration than Ad patients ($p= 0.0052$).

The main therapeutic management for Ad patients was use of nebulization (42.11%). However, the percentage of negative patients that was treated with nebulization was higher (54.71%, $p= 0.0788$), as well as RSV patients (75.47%, $p= 0.0000$). Antibiotics were given to 31.58% of Ad patients. There was no statistically significant difference between this percentage and those of negative, RSV, or influenza A patients. A few Ad patients required supplemental oxygen (7.02%) and corticosteroid therapy (5.26%). Regarding these two therapeutic tools the only statistically significant difference was found between the percentage of Ad patients and those of RSV patients, for whom the use of corticosteroids was 26.27% ($p= 0.0001$).

DISCUSSION

Adenoviruses are a frequent cause of ARI, and they represented the second most identified viral agent in cases of LRTI among hospitalized children in several studies (Larrañaga *et al.* 2000, Carballal *et al.* 2001, Dalmás *et al.* 2003, Straliozzo *et al.* 2004). In this study Ad were responsible for 1.86% of all cases of ARI, representing the fourth more frequent virus identified. This finding was similar to that of Moura (2001) that conducted a study with the same methodology in the city of Salvador, Brazil. Other Brazilian studies that utilized viral isolation and included outpatients and hospitalized patients have shown Ad as the second or third more frequent virus, responsible for 3.4 to 5.9% of cases of ARI (Nascimento *et al.* 1991, Arruda *et al.* 1991, Portes *et al.* 1998, Souza *et al.* 2003).

Cases of ARI due to Ad occurred in small numbers along the year without a particular seasonality. It was not observed either any association with the rainy season. In some studies performed in Brazil and other countries it was not found a seasonal pattern either (Cabello *et al.* 2006, Lin *et al.* 2004, Arruda *et al.* 1991). However, some studies have shown the occurrence of outbreaks in winter and spring, demonstrating a seasonal trend (Kim *et al.* 2000, Carballal *et al.* 2001, Costa *et al.* 2006).

Most cases of Ad ARI (73.65%) occurred in children up to two years old, and compares to 50.7 to 87.2% observed in other studies (Nascimento *et al.* 1991, Chew *et al.* 1998, Kim *et al.* 2000, Cabello *et al.* 2006). The incidence of adenoviral infections in children is low until the age of six months because of maternal antibodies (Mitchell *et al.* 2000, Hong *et al.* 2001, Walls *et al.* 2003). In this study it was observed that only 10.5% of Ad patients were included in this age range, and this percentage was similar to that found in other studies (Chew *et al.* 1998, Costa *et al.* 2006).

Most Ad patients were attended in the out-patient facility, reflecting the lower severity of disease in these patients. In general, most studies are conducted with hospitalized children presenting with LRTI, that makes the comparison difficult. However, studies

including patients with ARI in general, show that the need of hospitalization is very variable, ranging from 23 to 90% (Nascimento *et al.* 1991, Tsai *et al.* 2001, Stralioetto *et al.* 2002, Reina *et al.* 2004).

Although it is known the influence of risk factors in the development or severity of Ad infections (Sutmoller & Maia, 1995, Prietsch *et al.* 2002, Reina *et al.* 2004, Munoz *et al.* 1998), it was not found statistically significant difference in the percentages of these factors between Ad patients and patients negative to all viruses investigated.

Most Ad patients in this study (70.2%) had URTI in accordance with other Brazilian studies with hospitalized and outpatients, that showed percentages ranging from 50 to 73% (Moura 2001, Costa *et al.* 2006, Souza *et al.* 2003). The percentage was lower in studies that included only or predominantly hospitalized children, ranging from 8 to 14% (Kim *et al.* 2000, Reina *et al.* 2004).

Among the cases of LRTI, pneumonia was the major infection (17.5%), followed by bronchiolitis (8.8%). Studies that evaluated only hospitalized children with symptoms of LRTI showed a predominance of pneumonia too, with percentages ranging from 63 to 93%, followed by bronchiolitis whose percentages ranged from 1.5 to 33% (Videla *et al.* 1998, Larrañaga *et al.* 2000, Hong *et al.* 2001, Chuang *et al.* 2003, Dalmás *et al.* 2003).

The main symptoms and signs presented by Ad patients were fever, cough, rhinorrhea, anorexia, and vomiting or diarrhea. Most reports about Ad ARI showed also high percentages of fever, ranging from 67 to 100%; cough, with percentages ranging from 85 to 100%; and gastrointestinal symptoms, mainly diarrhea (Han *et al.* 1998, Mitchell *et al.* 2000, Hong *et al.* 2001, Farnng *et al.* 2002, Dalmás *et al.* 2003, Chen *et al.* 2004, Dominguez *et al.* 2005).

Conjunctivitis was found in Ad patients in higher percentages than in other groups of patients. Almost all studies reported the presence of conjunctivitis in Ad patients with percentages up to 33% (Mitchell *et al.* 2000 Farnng *et al.* 2002, Dalmás *et al.* 2003, Chuang *et*

al. 2003, Chen *et al.* 2004, Rocholl *et al.* 2004, Dominguez *et al.* 2005). Another common sign present in these patients was rash, that may be present in 5 to 31% of patients (Mitchell *et al.* 2000, Hong *et al.* 2001, Farng *et al.* 2002, Chen *et al.* 2004, Rocholl *et al.* 2004, Dominguez *et al.* 2005). In this study it was found in 5.4% of Ad patients, and this percentage was significantly higher than that of other groups of patients.

Radiographic findings of adenoviral LRTI include bilateral hyperaeration, bronchial wall thickening, and patchy areas of opacification (Han *et al.* 1998). It may also be present pleural effusion (Munoz *et al.* 1998, Mitchell *et al.* 2000, Rieger-Fackeldey *et al.* 2000, Hong *et al.* 2001, Farng *et al.* 2002, Chuang *et al.* 2003, Dalmás *et al.* 2003). In patients from this study the main findings were interstitial infiltration and consolidation. None of the patients presented pleural effusion.

Ad patients were treated with nebulization, antibiotics, supplemental oxygen, and corticosteroids. In several studies the use of antibiotics was variable, ranging from 46 to 91% of patients (Chuang *et al.* 2003, Chen *et al.* 2004, Rocholl *et al.* 2004, Reina *et al.* 2004, Stralioetto *et al.* 2004). Corticosteroid therapy was used in up to 40% of patients (Reina *et al.* 2004; Stralioetto *et al.* 2004). Supplemental oxygen was used by 46% of patients (Hong *et al.* 2001), and bronchodilators by 60% (Reina *et al.* 2004). Antiviral drugs such as ribavirin and cidofovir have been used in disseminated Ad disease but without proven efficacy (Walls *et al.* 2003).

None of Ad patients in this study died. The mortality rate in several reports may range from 4.2 to 14.8% among pediatric patients with LRTI (Hong *et al.* 2001, Farng *et al.* 2002, Chuang *et al.* 2003, Dalmás *et al.* 2003).

REFERENCES

Arruda E, Hayden FG, Mcauliffe JF, Sousa MA, Mota SB, Mcauliffe MI, Geist FC, Carvalho EP, Fernandes MC, Guerrant RL, Gwaltney JR JM 1991. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J Infect Dis* 164:252-258.

Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I 2006. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:21-24.

Carballal G, Videla CM, Espinosa MA, Savy V, Uez O, Sequeira MD, Knez V, Requeijo PV, Posse CR, Miceli I 2001. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *J Med Virol* 64:167-174.

Chen HL, Chiou SS, Hsiao HP, Ke GM, Lin YC, Lin KH, Jong YJ 2004. Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in southern Taiwan in 2001-2002. *J Trop Pediatr* 50:279-284.

Chew FT, Doraisingham S, Ling AE, Kumarasinghe G, Lee BW 1998. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiol Infect* 121:121-128.

Chuang YY, Chiu CH, Wong KS, Huang JG, Huang YC, Chang LY, Lin TY 2003. Severe adenovirus infection in children. *J Microbiol Immunol Infect* 36:37-40.

Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TFM, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Oliveira RC, Ribeiro LZG, Queiróz DAO 2006. Respiratory

viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:301-306.

Dalmás S, Pereyra ML, Pirez MC, Mateos S, Varela A, Chiparelli H, Montano A, Ferrari AM 2003. Infección respiratoria aguda baja por adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años. *Arch Pediatr Urug* 74:15-21.

Dominguez O, Rojo P, de las Heras S, Folgueira D, Contreras JR 2005. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 24:733-734.

Farng KT, Wu KG, Lee YS, Lin YH, Hwang BT 2002. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* 35:37-41.

Han BK, Son JA, Yoon HK, Lee SI 1998. Epidemic adenoviral lower respiratory tract infection in pediatric patients: radiographic and clinical characteristics. *Am J Roentgenol* 170:1077-1080.

Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, Kim WS 2001. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 32:1423-1429.

Kim MR, Lee HR, Lee GM 2000. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. *J Infect* 41:152-158.

Larrañaga C, Kajon A, Villagra E, Avendaño LF 2000. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). *J Med Virol* 60:342-346.

Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC 2004. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. *J Clin Virol* 30:81-85.

Mitchell LS, Taylor B, Reimels W, Barrett FF, Devincenzo JP 2000. Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 19:996-1000.

Moura FEA. Infecções respiratórias agudas virais em crianças de Salvador: caracterização antigênica e genômica dos vírus sincicial respiratório e adenovírus isolados e correlação clínico-epidemiológica. 2001. 196p. Doctor's Degree thesis – Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Moura FEA, Borges LC, Portes SAR, Ramos EAG, Siqueira MM 2003. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:739-743.

Munoz FM, Piedra PA, Demmier GJ 1998. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. *Clin Infect Dis* 27:1194-1200.

Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F, Krawczuk MM, Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ 1991. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33:287-296.

Portes SAR, Silva EE, Siqueira MM, Filippis AMB, Krawczuk MM, Nascimento JP 1998. Enteroviruses isolated from patients with acute respiratory infections during seven years in Rio de Janeiro (1985-1991). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40:337-342.

Prietsch SOM, Fischer GB, Cesar JA, Fabris AR, Mehanna H, Ferreira THP, Scheifer LA 2002. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. *J Pediatr (Rio J.)* 78:415-422.

Reina J, Ferres F, Gutiérrez O, Gopegui ER, González-Cárdenas M 2004. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). *An Pediatr (Barc.)* 61:137-142.

Rieger-Fackeldey E, Aumeier S, Genzel-Boroviczény O 2000. Disseminated adenovirus infection in two premature infants. *Infection* 28:237-239.

Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL 2004. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 113:e51-e56.

Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R 2004. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 42:3963-3969.

Shen K, Zhaori G, Zwegberg-Wirgart B, Ying M, Grandien M, Wahren B, Linde A 1996. Detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions with immunofluorescence technique for multiplex screening – an evaluation of the Chemicon assay. *Clin Diag Virol* 6:147-154.

Shetty AK, Treynor E, Hill DW, Gutierrez KM, Warford A, Baron EJ 2003. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 22:789-794.

Souza LSF, Ramos EAG, Carvalho FM, Guedes VMCR, Souza LS, Rocha CM, Soares AB, Velloso LF, Macedo IS, Moura FEA, Siqueira M, Fortes S, Jesus CC, Santiago CMG, Carvalho AMS, Arruda E 2003. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol* 35:184-191.

Straliozzo SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TMR 2004. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:883-7.

Sutmoller F, Maia PR 1995. Acute respiratory infections in children living in two low income communities of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90:665-674.

Takimoto S, Grandien M, Ishida MA, Pereira MS, Paiva TM, Ishimaru T, Makita FM, Martinez CHO 1991. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol* 29:470-474.

Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR 2001. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39:111-118.

Videla C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M 1998. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. *Clin Diag Virol* 10:17-23.

Walls T, Shankar AG, Shingadia D 2003. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 3:79-86.

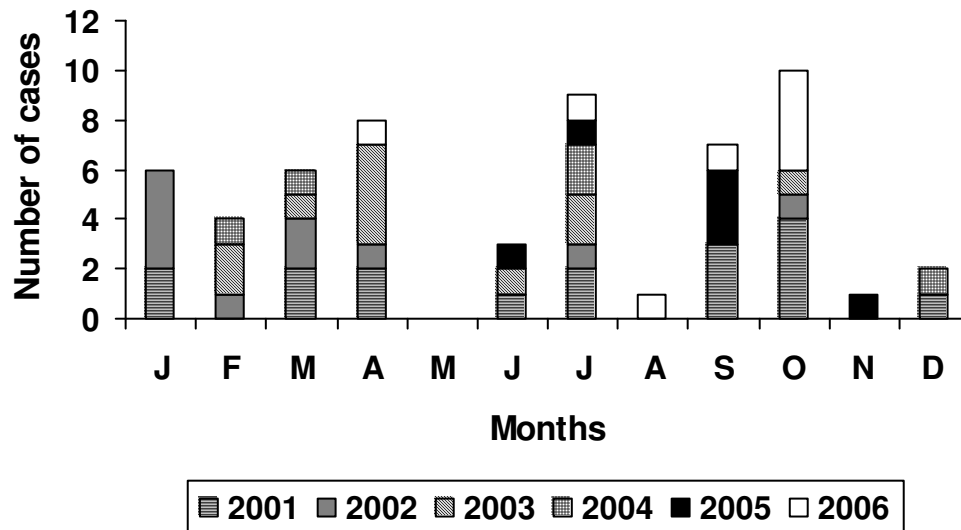


FIGURE 1 – Mensal distribution of cases of acute respiratory infections due to adenovirus in the period of study.

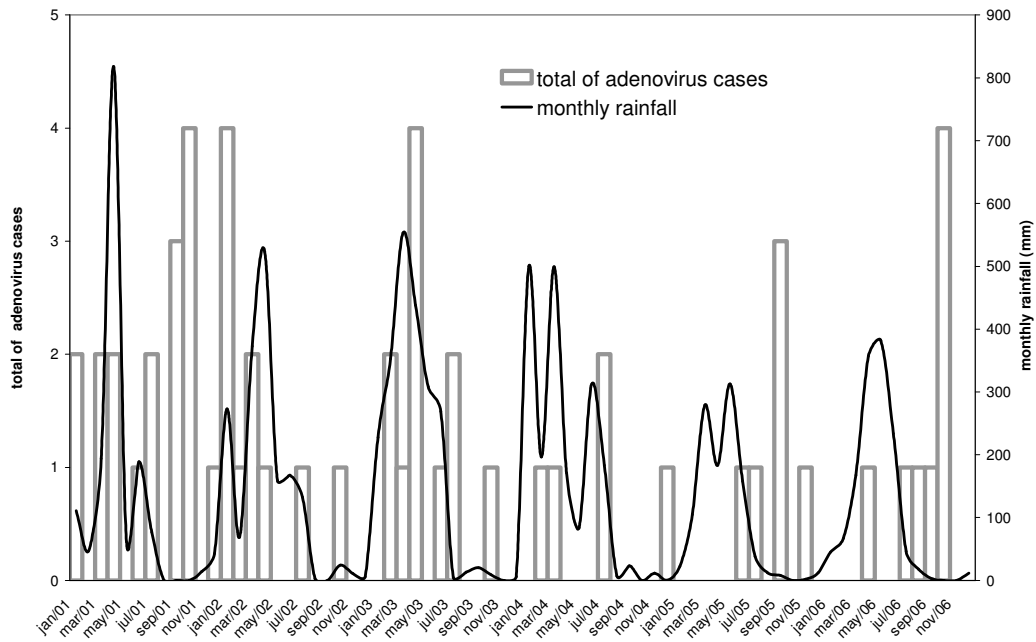


FIGURE 2 – Monthly distribution of cases of acute respiratory infections due to adenovirus and rainfall, Fortaleza, Brazil, from January 2001 to December 2006.

TABLE 1 – Demographic characteristics of patients with acute respiratory infections

Characteristic	Patients negative to all viruses (%)	Adenovirus patients (%)
Gender		
Male	1154 (54.08)	34 (59.65)
Female	980 (45.92)	23 (40.35)
Age (months)		
0-6	460 (21.54)	6 (10.53)
7-12	543 (25.43)	14 (24.56)
13-18	293 (13.72)	8 (14.03)
19-24	292 (13.68)	14 (24.56)
25-60	403 (18.88)	13 (22.81)
>60	144 (6.74)	2 (3.51)
Locale of attending		
Out-patient facility	642 (30.14)	29 (50.88)
Emergency room	1277 (59.95)	23 (40.35)
In-patient wards	211 (9.91)	5 (8.77)
Clinical diagnosis		
Upper respiratory tract infection	1242 (58.42)	40 (70.18)
Lower respiratory tract infection	884 (41.58)	17 (29.82)

Antigenic and genomic characterization of adenovirus associated to respiratory infections in children living in Northeast, Brazil.

Fernanda EA Moura[†], Jacó R Mesquita, Silvana AR Portes^{*}, Eduardo AG Ramos^{*},
Marilda M Siqueira^{*}**

INTRODUCTION

Adenoviruses (Ad) are a significant cause of acute respiratory infections (ARI), including bronchiolitis and pneumonia, in infants and young children. Among the 51 serotypes of human Ad identified to date, the serotypes more frequently recovered from children with acute respiratory infections are Ad type 1 (Ad1), Ad2, Ad3, Ad5, and Ad7. Several studies have suggested that serotypes Ad3, Ad7 and, less frequently, Ad 21 are involved in outbreaks of severe infections in children [1].

In clinical practice, when the role of Ad is suspected in cases of ARI, the diagnosis is currently based on viral isolation techniques, immunofluorescence and, enzyme-linked immunosorbent assays [2]. Polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and immunochromatographic kits have recently become available for this purpose [3]. Typing of Ads isolates can be achieved by neutralization, hemmagglutination inhibition, restriction endonuclease analysis (REA), sequencing and, PCR combined with REA [4, 5]. Until recently, the interest in serotype and genotype determination of Ad isolates was mainly of epidemiological interest, however, this has changed due to the increasingly clear association between specific serotypes and genotypes and more severe disease presentation. Genome typing or REA has been used to ascertain the genetic variation within the species. The identification of genome types offers a chance to follow the epidemiological distribution of these viruses in time and space and allows their pathogenic and other biological characteristics to be compared.

Several reports of the genomic characterization of Brazilian Ad isolates from patients with respiratory, ocular and gastrointestinal infections have been published since 1988, but none of them included any Ad isolates of patients living in northeast Brazil [6-11].

The purpose of this retrospective study was describe epidemiological, clinical and, viral characteristics of IRAs by adenovirus in a group of children attended in a teaching hospital in the city of Salvador during the year of 1998.

MATERIAL AND METHODS

Samples of nasopharyngeal aspirates were collected from children presenting upper or lower acute respiratory tract infections that were attended at Centro Pediátrico Hosanah de Oliveira (CPHO) in the city of Salvador, Northeast Brazil from January to December 1998. Children under 5 years of age and with disease of less than seven days of evolution were included in the study. All samples were tested by an indirect immunofluorescence assay (IFA) to Ad, respiratory syncytial virus (RSV), influenza A and B, parainfluenzaviruses 1, 2 and 3 (Chemicon International, Inc.). All samples were inoculated on HEp-2 cells that were grown in Eagle's Minimal Essential Medium containing 10% of fetal bovine serum, 30 mg/mL, 100 µL peniciline and 50µL gentamicine. The cells were observed daily to detect the cytopathic effect (CPE). IFA was performed to confirm the isolation of Ad. All Ad isolated strains were serotyped by neutralization with rabbit reference antisera for Ad types 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, following standard protocols [12].

HEp-2 cells grown in 75cm²plastic flasks were inoculated with Ad that were stocked at – 70°C. Viral DNAs were extracted from infected cells as described previously [13]. Aliquots containing 1-2 Cg of viral DNAs were digested with 10 units of different endonucleases (*Bam* HI, *Bgl* II, *BstE* II, *Hind* III and *Sma* I) under conditions specified by the manufacturers (Boehringer, Mannheim, Germany). DNA fragments were loaded onto 1.2% agarose gels. Bands were observed by using a transilluminator and photographed using Polaroid Land film 665 or 667. The resulting restriction profiles were assigned to

corresponding virus species and genotypes according to the literature data.

RESULTS

From January to December 1998, 482 NPA samples were collected, 360 from patients attended in the emergency department and 122 from hospitalized patients. Viral infections were detected in 154 patients. Adenoviral infections (11 cases) represented 7.1% of viral infections and 2.2% of all cases of ARI. Ad were the fourth viral agent after RSV, influenza A and parainfluenza 3. The majority of patients with Ad infections (81.8%) were attended in the emergency department. Adenoviral infections were observed in children aged two months to four years, however most of them occurred during the first year of their lives (81.8%). The majority of infections caused by adenoviruses (63.6%) were diagnosed as upper respiratory tract infections (URTI). Cases of lower respiratory tract infections (LRTI) were observed in outpatients and those hospitalized. Characteristics of the children with ARI caused by adenovirus are shown in Table.

All of the 11 adenoviruses detected by IFA were isolated in HEp-2 cells.

The genomic analysis showed that 83.3% of the analyzed isolates belonged to the species HAdV-C and 16.7% to HAdV-B. The seroneutralization test identified four Ad1, two Ad2, one Ad5 and, four Ad7. The restriction profiles of adenoviruses analysed in this study are shown in Figures 1 and 2. Two DNA variants were observed among strains classified as Ad1, one was identified as genome type D1 and three as D10. Strains of Ad2 were characterized as genome type D5. The only Ad5 of this study had a similar pattern to that named as 5# in an Argentine study [14]. All four Ad7 identified were characterized as 7h.

DISCUSSION

In this study Ad infections were more prevalent in the children who were attended in the emergency department than those attended in the wards. This finding differs from data reported by other Brazilian and South American studies, which indicate Ad as the second most prevalent virus in ARI observed in hospitalized children [9, 15-17]. In this study the rate of ARI by Ad in hospitalized patients was 1.6%, while in other studies this rate ranged from 3.3% to 12.6% [17-20]. Respiratory infections by Ad are generally characterized as self-limited mild upper disease, however lower respiratory tract infections can occur, and some cases present as severe pneumonia followed by respiratory failure, serious sequelae or fatal outcome [21, 22]. In other similar studies, Ad was seen to act as an agent of URTI [18, 23]. In a recent study, Ad were detected in 9.4% of nasal swab samples collected from outpatients with flu-like symptoms [23]. The impact and severity of Ad infections were shown in a study of viral acute lower tract infections in children admitted to the pediatric intensive care unit of two hospitals in the city of Porto Alegre [24]. In that study, 7.7% of viral respiratory infections were due to Ad. Moreover those infections showed a high case fatality rate of 25%.

During the twelve months of study, Ad infections were observed year round without a clear seasonality as it was observed in other Brazilian cities and in other tropical countries [15, 25-27].

Referring to the antigenic diversity of Ad associated to children ARI in Salvador in 1998 it was observed that members of species C predominated, in accordance with other studies [23, 28]. This characteristic differs to those seen in studies in Argentina and Chile where members of species B were the most prevalent [17, 29-31].

In spite of the small number of Ad analyzed, the results of this study show a relative genetic variability for members of species C, as observed previously [9, 11, 28]. Several studies have shown that one particular genotype can circulate in different geographic

regions in different years. The data obtained in this study show that genotypes circulating in Salvador during 1998 had circulated in other Brazilian cities and other South American countries in previous years. The genotypes D1 and D10 of Ad1 and the genotype D5 of Ad2 identified in Salvador during 1998 had circulated in the cities of Belém and Rio de Janeiro in the 80s and early 90s [9]. The only Ad5 detected in Salvador had circulated in Argentina between 1984 and 1988 [14].

The finding of four Ad of genotype 7h in Salvador in 1998 confirms the tendency of this genotype to spread rapidly, since it was first identified in Argentina [22]. The occurrence of this genome type remained restricted in countries of South Cone of South America (Argentina, Chile and Uruguay) until 1994, when it was identified in Southeast Brazil associated to a case of follicular conjunctivitis [32]. The circulation of this genome type outside of South America occurred in 1996 in Japan and in 1998 in Southeast of United States [33, 34]. The first identification of Ad7h in case of ARI in Brazil occurred in 1995 [11]. Previous analysis of Ad7 in Brazil had identified only the genome types Ad7b and Ad7e [7, 9]. The analysis of 40 strains of Ad7 identified in cases of ARI in patients living in South and Southeast Brazilian regions showed that in a period of twelve years (1980-1981) only the genome types Ad7b and Ad7e were identified [7]. Similar result was observed among 14 strains of Ad7 isolated from respiratory specimens from patients with ARI living in North and Southeast regions between 1976 and 1995 [9]. In the more recent Brazilian study about molecular epidemiology of adenovirus revealed that all 17 serotype 7 isolates belong to genome type 7h [11]. Shifts or replacements of genome types of Ad7 had been reported in the former Soviet Union, Argentina and Australia [22, 35, 36]. More continuous studies with a larger number of strains in analysis are required in order to characterize if in Brazil the genome types Ad7b and Ad7e were replaced by Ad7h as has been suggested in the Brazilian studies cited previously.

Although the results of this study do not reflect the impact of Ad infections in children living in Salvador, it could relate about the local antigenic variability and give the first data about genotypes of Ad circulating in northeast Brazil.

REFERENCES

1. Kim YJ, Hong JY, Lee HJ *et al.* Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4594–4599.
2. Vabret A, Gouarin S, Joannes M *et al.* Development of a PCR-and hybridizationbased assay (PCR Adenovirus Consensus) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2004; 31:116-122.
3. Fujimoto T, Okafuji T, Ito M *et al.* Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5489-5492.
4. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505.
5. Sarantis H, Johnson G, Brown M *et al.* Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3963-3969.
6. Gomes SA, Gabbay YB, Nascimento JP, Niel C. Genome analysis of adenovirus 4a, a causative agent of pharyngoconjunctival fever and respiratory diseases in Brazil. *J Med Virol* 1988; 26: 453-459.

7. Moraes MT, Leite JP, Siqueira MM *et al.* Genomic characterization of adenovirus serotype 7 isolated in Brazil from acute respiratory disease patients during the period from 1980 to 1991. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 185-189.
8. Moraes MT, da Silva M, Leite JP, Nascimento JP. Genetic and antigenic analysis of adenovirus type 3 strains showing intermediate behavior in standard seroneutralization test. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 231-235.
9. Kajon AE, Portes SA, de Mello WA *et al.* Genome type analysis of Brazilian adenovirus strains of serotypes 1, 2, 3, 5 and 7 collected between 1976 and 1995. *J Med Virol* 1999; 58: 408-412.
10. de Albuquerque MC, da Silva FM, Soares CC *et al.* Adenoviruses isolated from civilian and military personnel in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 233-236.
11. Moura PO, Roberto AF, Hein N *et al.* Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2007; 79: 174-81.
12. Hierholtzer, J. C. Adenoviruses 1995. In: EH Lennette, DA Lennette, ET Lennette, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7th ed., American Public Health Association., Washington DC, 1995:169-188.
13. Shinagawa M., Matsuda A., Ishiyama T *et al.* A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol* 1983; 27: 817-822.

14. Kajon AE, Wadell G 1992. Molecular epidemiology of adenoviruses associated with acute lower respiratory disease of children in Buenos Aires, Argentina (1984-1988). *J Med Virol* 1992; 36: 292-297.
15. Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F *et al.* Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 33: 287-296.
16. Straliootto SM, Siqueira MM, Muller RL *et al.* Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 283-291.
17. Larrañaga C, Kajon A, Villagra E, Avendano LF. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). *J Med Virol* 2000; 60: 342-346.
18. Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 111-118.
19. Hong JY, Lee HJ, Piedra PA *et al.* Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1423-1429.
20. Chen HL, Chiou SS, Hsiao HP *et al.* Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in Southern Taiwan in 2001-2002. *J Trop Pediatrics* 2004; 50: 279-284.

21. Farnig KT, Wu KG, Lee YS et al. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35: 37-41.
22. Kajon A, Wadell G. Genome analysis of South American adenovirus strains of serotype 7 collected over a 7-year period. *J Clin Microb* 1994; 32: 2321-2323.
23. Echavarría M, Maldonado D, Elbert G et al. Videla C, Rappaport P, Carballal G 2006. Use of PCR to demonstrate presence of adenovirus species B, C, or F as well as coinfection with two adenovirus species in children with flu-like symptoms. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 625-627.
24. Stralioatto SM, Siqueira MM, Machado V, Maia. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 883-887.
25. Arruda E, Hayden FG, McAuliffe JF et al. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J Infect Dis* 1991; 164: 252-258.
26. Shek LPC; Lee BW 2003. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatric Respiratory Reviews* 2003; 4: 105-111.
27. Tsuchiya LR, Costa LM, Raboni SM et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect* 2005; 51: 401-407.
28. Frabasile S, Viturera N, Perez G et al. Genotyping of Uruguayan human adenovirus isolates collected between 1994 and 1998. *Acta Virologica* 2005; 49: 129-132.

29. Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C *et al.* Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996; 48: 151-156.
30. Videla, C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. *Clin Diagn Virol* 1998; 10: 17-23.
31. Carballal G , Videla C, Misirlian A *et al.* Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 16: 2-6.
32. Tanaka K, Itoh N, Saitoh-Inagawa W *et al.* Genetic characterization of adenovirus strains isolated from patients with acute conjunctivitis in the city of São Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2000; 61:143-149.
33. Hashido M, Mukoyama A, Sakae K *et al.* Molecular and serological characterization of adenovirus genome type 7h isolated in Japan. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 281-286.
34. Erdman DD, Xu W, Gerber SI *et al.* Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emer Infect Dis* 2000; 8: 269-277.
35. Galovina GI, Zolotaryov FN, Yurlova TI. Sensitive analysis of genetic of genetic heterogeneity of adenovirus 3 and 7 in the Soviet Union. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2313-2121.

36. Li QG, Wadell G. Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated in five continents. *J Virol* 1986; 60: 331-335.

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

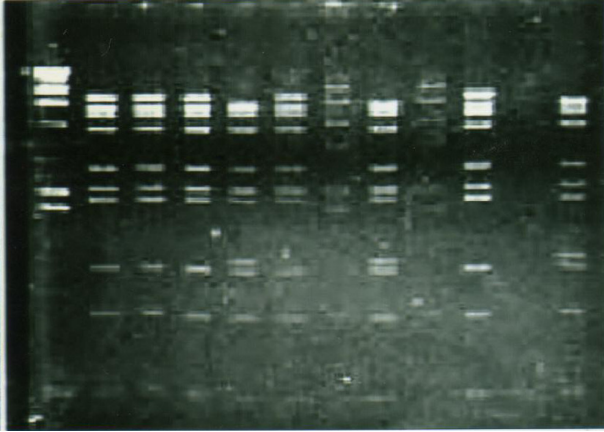


Figure 1. Restriction profiles of adenoviruses isolated after digestion with *Sma* I. MW: molecular weight marker. Lines 1, 2, 3, 5, 9 (Ad2); Lines 4, 7 and 10 (Ad1); Lines 6 and 8 (Ad7).

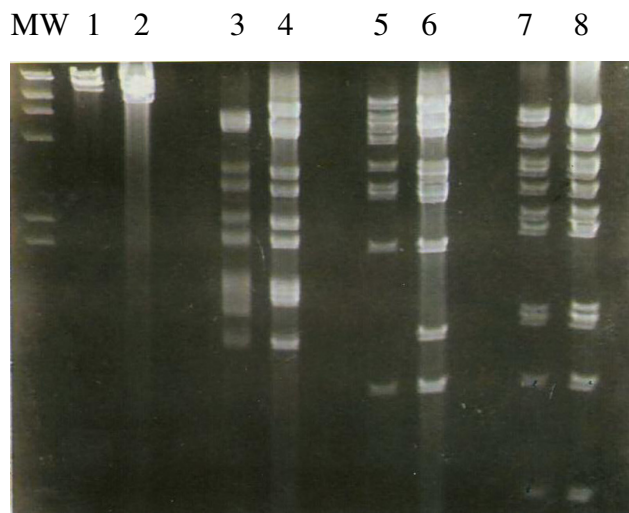


Figure 2. Restriction profiles of only adenovirus 5 isolated. MW: molecular weight marker. Lines 1, 3, 5, 7 (Ad prototype 5 after digestion with *Bam* HI; *Bgl* II; *Hind* III and *Sma*I, respectively); Lines 2, 4, 6 and 8 (Ad type 5 isolated in the study after digestion with *Bam* HI; *Bgl* II; *Hind* III and *Sma*I, respectively).