



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

THAINARA CALIXTO DA PAZ

**Adenovírus em amostras fecais e do trato respiratório de crianças
atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás**

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

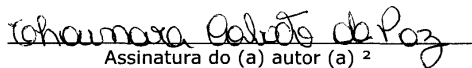
Nome completo do autor: Thainara Calixto da Paz

Título do trabalho: **Adenovírus em amostras fecais e do trato respiratório de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 18 / 01 /2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

THAINARA CALIXTO DA PAZ

**Adenovírus em amostras fecais e do trato respiratório de crianças
atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás
para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Menira Borges de
Lima Dias e Souza

Goiânia
2016

CALIXTO DA PAZ, THAINARA

Adenovírus em amostras fecais e do trato respiratório de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás [manuscrito] / THAINARA CALIXTO DA PAZ. - 2016.

XII, 62 f.

Orientador: Prof. Menira Borges de Lima Dias e Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. HAAdV. 2. crianças sintomáticas e assintomáticas. 3. carga viral. I. Borges de Lima Dias e Souza, Menira, orient. II. Título.

CDU 578



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE THAINARA CALIXTO DA PAZ - Aos cinco dias do mês de dezembro do ano de 2016 (05/12/2016), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, ERIKA REGINA LEAL DE FREITAS e FABIÓLA SOUZA FIACCADORI, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“ADENOVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS E DO TRATO RESPIRATÓRIO DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM HOSPITAL DE GOIÂNIA, GOIÁS”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **THAINARA CALIXTO DA PAZ**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1271/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Aprovada / Reprovada

Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Aprovada

Dra. Erika Regina Leal de Freitas

Aprovada

Dra. Fabíola Souza Fiaccadori

Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 05 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar em, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

— 11 —

Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG)

Dra. Erika Regina Leal de Freitas (IFG)

Dra. Fabíola Souza Fiaccadori (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Menira Borges de Lima Dias e Souza
Erika Regina Leal de Freitas
Fabiola Souza Fiaccadori
Kariny Vieira Soares e Silva

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Thainara Calixto da Paz

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Membros:

1. Prof^ª. Dr^ª. Menira Borges de Lima Dias e Souza

2. Prof^ª. Dr^ª. Fabíola Souza Fiaccadori

3. Prof^ª. Dr^ª. Érika Regina Leal de Freitas

Data: 05/12/2016

Aos meus pais, por todo carinho e dedicação. São exemplos de vida que levarei comigo eternamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A minha orientadora Prof. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza, pelo orientações, apoio, confiança e atenção. Serei eternamente grata por todo que aprendi durante o meu tempo no Laboratório de Virologia Humana e por tudo que me ensinou.

A prof. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori, pelos ensinamentos adquiridos na graduação e pós-graduação, sou muito grata a você.

Aos meus pais Antônio, Izabel e Maria, a minhas irmãs lindas (Thaís e Talita) e aos meus sobrinhos que amo tanto Bianca, Lorenzo e Enzo Gabriel. A minha família por todo suporte emocional em especial a Quezia, sem vocês nada do que eu faço teria sentido.

A Keili Maria, a Francielly e a Nathânia Dabilla que me ajudaram muito na bancada, nos trabalhos, em geral, em toda minha vida acadêmica sou muito grata, Deus e eu sabe o tanto que vocês são especiais. A Tâmera pela disposição, sempre ajudando principalmente na análise filogenética.

Ao meu parceiro, confidente e namorado por me suportar, sempre me apoiando a continuar, por todo carinho e dedicação.

A todos que fizeram parte do laboratório de Virologia Humana durante minha estadia, sempre nos ajudando, Hugo, Ítalo, Tom, Thais Santana, Thais Santos, Kareem, Thaynara, Joãozinho e Joãozão, Anniely, Terezinha, Raíssa, Romário, Marina, Paulo Henrique, Brunno, Lucélia e Pedro.

Aos meus amigos que são minha segunda família, pelos inúmeros conselhos e palavras de estímulo, Géssica (muié), Karlinha, Welsem, Eva, Thays, Dayane, obrigado pela paciência e compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE QUADRO	VIII
LISTA DE TABELA	VIII
LISTA DE ANEXOS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	X
RESUMO	X1
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS	1
1.2 ESTRUTURA E REPLICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS	2
1.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	6
1.4 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS	7
1.5 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS	10
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS	13
1.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 POPULAÇÃO E MATERIAL DE ESTUDO	19
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS	19
4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO TRATO RESPIRATÓRIO	20
4.4 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES E DO TRATO RESPIRATÓRIO	
4.4.1 Amostras de fezes	20
4.4.2 Amostras do trato respiratório	20

4.5 PESQUISA DE HAdVs E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL TaqMan (qPCR)	21
4.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	22
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICES E ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da partícula viral dos HAdVs	3
Figura 2	Micrografia representativa de uma partícula de adenovírus	4
Figura 3	Representação esquemática do genoma dos HAdVs	5
Figura 4	Gráfico representativo de uma corrida de qPCR (gráfico de amplificação)	22
Figura 5	Gráfico representativo de uma corrida de qPCR com curva padrão de amostras fecais de crianças assintomáticas participantes do estudo	28
Figura 6	Árvore filogenética das sequências parciais das sete regiões hipervariáveis do hexon dos adenovírus detectados no estudo	30
Figura 7	Gráfico representativo da distribuição do índice de positividade para HAdVs em amostras fecais com relação a dados pluviométricos (mm ³) no período do estudo	26
Figura 8	Gráfico representativo da distribuição do índice de positividade para HAdVs em amostras de <i>swab</i> nasofaríngeano com relação a dados pluviométricos (mm ³) no período do estudo	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Associação entre os diferentes tipos HAdV e sintomatologia em humanos	8
Quadro 2	Características epidemiológicas e índices de detecção de adenovírus na população infantil em diferentes partes do mundo	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da população e positividade global para adenovírus	24
Tabela 2	População estratificada em sintomatologia e positividade	25

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Parecer do comitê de ética	52
Anexo 2	Termo de consentimento livre e esclarecido	57
Anexo 3	Ficha de investigação clínica	61

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CAR	Coxsackie (Receptor de adenovírus)
CDC	Centers for Disease Control (Centro para Controle de Doenças)
CG	Cópias genômicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIE	Ensaio Imunoenzimático
GEA	Gastroenterite aguda
HAdVs	Adenovírus humanos
HMI	Hospital Materno Infantil
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mm ³	Milímetros cúbicos
NCBI	National Center for Biotechnology Information DataBase
PCR	<i>Polymerase chain Reaction</i> (Reação em Cadeia pela Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

Os adenovírus humanos (HAdVs) são importantes agentes causadores de gastroenterite aguda e doença respiratória, principalmente entre as crianças menores de cinco anos de idade. Dados sobre a carga viral, em mais do que um tipo de amostra clínica obtida de um mesmo indivíduo durante a infecção, ainda são escassos. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a frequência do HAdVs, determinar a carga viral em amostras clínicas, e proceder a caracterização molecular de amostras positivas de crianças até aos cinco anos de idade, em associação com a sintomatologia. Foram incluídas no estudo amostras de 200 crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia, Goiás; entre março de 2014 e julho de 2015. Uma amostra fecal e um *swab* nasofaríngeo foram obtidos de cada criança. As amostras foram submetidas a extração, utilizando kit comercial (RNA mini-kit, Qiagen), e triadas por ensaio RT-qPCR (TaqMan, Life Technologies), com iniciadores e sonda específicos para a região codificadora do hexon. Foi observado índice global de positividade para HAdVs de 21% (42/200), o índice de positividade nas fezes foi 16% (32/200) e em *swab* foi de 9,5% (19/200). Entre as crianças sintomáticas (n=129), 21% foram positivas em amostras fecais (22/105) e 9,2% (10/108) em amostras de *swabs*. Ainda, 4,5% (9/200) foram positivas em ambas as amostras clínicas. Cargas virais elevadas foram observadas em amostras de crianças sintomáticas e assintomáticas, maior positividade foi encontrada em crianças sintomáticas com maiores cargas virais. Foram detectados HAdV tipos 3 da espécie B e 41 da espécie F de HadV. Esperamos que os dados obtidos possam auxiliar em um melhor entendimento da patogenia dos HAdV na população infantil.

PALAVRAS-CHAVE: HAdV, crianças sintomáticas e assintomáticas, carga viral

ABSTRACT

Human adenoviruses (HAdVs) may cause several clinical syndromes, and are a major cause of respiratory and acute gastroenteritis (AGE), especially among children. However, data on viral load, in more than one type clinical sample obtained from the same child, are still scarce. The aims of the present study were to evaluate the frequency of the HAdV, to determine the load viral in clinical samples, and to proceed molecular characterization of positive samples from children up to five years of age in association with symptomatology. For this, 200 children attended at Hospital Materno Infantil in Goiânia, Goiás; between March 2014 ad July 2015. One fecal and one nasopharyngeal swab sample was obtained from each child. The clinical samples (fecal and nasopharyngeal swabs) were submitted the DNA extraction by a commercial kit (Qiagen-Hilden, Alemanha), and screened by RT-qPCR (TaqMan) assay, with specific primers and probe targeting the hexon region of HAdV genome. The global frequency of HAdVs was 21% (42/200). Positivity in swabs was 9.5% (19/200), and in fecal samples 16% (32/200). Among the symptomatic children (n=129), 21% were positive in fecal samples (22/105) and 9.2% (10/108) in swab samples. Futhermore, 4.5% (9/200) were positive in both clinical samples. High viral loads were observed in both fecal and nasopharyngeal swab samples from symptomatic and asymptomatic children, and major positivity was found in symptomatic children with high load viral. High viral loads were observed in samples from symptomatic and asymptomatic children. Major positivity and load viral was found betwenn symptomatic children. HAdV types 3 of species B and 41 of HadV F species were detected. We hope that the data obtained can help in a better understanding of the pathogenesis of HAdV in children.

Key words: HAdVs, symptomatic and asymptomatic children, load viral

1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS

Os adenovírus humanos (HAdVs) foram descobertos acidentalmente em 1953, quando pesquisadores tentavam estabelecer culturas a partir de tecidos de adenoides e tonsilas a serem utilizados na identificação do vírus responsável pelo resfriado comum, a partir de amostras do trato respiratório de militares com sintomas respiratórios (Rowe et al. 1953, Hilleman & Werner 1954 apud Ginsberg et al. 1999). Inicialmente este agente foi chamado de “vírus da degeneração da adenoide”, “vírus adenóide-faríngeo” e “vírus da doença respiratória aguda”, sendo posteriormente denominado adenovírus, em razão do tipo de células nas quais foram originalmente isolados (Enders et al. 1956).

Em estudos realizados entre 1965 e 1970 foram identificados os adenovírus tipo 4 e, posteriormente o tipo 7 como causador de epidemias de infecções respiratórias em militares, sendo elucidada a importância como agente causador de infecções respiratórias esforços foram estabelecidos para a produção da primeira vacina para conferir proteção contra os tipos adenovírus 4 e 7. Os HAdVs foram identificados como a principal causa de hospitalizações no exército dos Estados Unidos no período durante o inverno daquele ano (Top et al. 1975). O programa de imunização de militares teve curta duração, chegando ao fim em 1999 (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Atualmente, ainda não há vacina de adenovírus disponível para a população em geral.

Os Adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, a qual é composta por cinco gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* e *Siadenovirus*. Apenas os adenovírus classificados no gênero *Mastadenovirus* são patogênicos para humanos, podendo ainda infectar diversos tipos de animais como morcegos, eqüinos, bovinos, murinos, ovinos, suínos dentre outros (Berk 2013, International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV 2015).

Os adenovírus humanos (HAdVs) são ainda classificados em sete espécies (A–G) de acordo com suas características biológicas, imunológicas, genéticas e bioquímicas, e em mais de setenta tipos por meio de análises da sequência do genoma completo dos HAdVs (ICTV 2013, Lion T 2012, Hage et al. 2015).

Os HAdVs são classificados nas diferentes espécies, a seguir. Na espécie A dos HAdVs estão classificados os tipos Ad12, 18, 31,61 na espécie B estão Ad3, 7, 11, 14,16, 21,34, 35, 50, 55,66 na espécie C Ad1, 2, 5, 6,37 na espécie D estão tipos Ad8 – 10,13, 15, 17, 19, 20, 22 – 30, 32, 33, 36 – 39, 42 – 49, 51, 53, 54, 56,58-60, 63-70 na espécie E o Ad4, na espécie F Ad 40 e 41 e na espécie G está o Ad52 (Berk 2013, Lion et al. 2014, Hage et al. 2015).

Desde então, os adenovírus vêm sendo associados a infecções do trato respiratório superior e inferior, do trato gastroentérico e diversas outras síndromes clínicas, tais como hepatite, ceratoconjuntivite, meningoencefalite, cistite e miocardite (Lichtenstein & Wold 2004, Wold & Ison 2013, Lion T 2014).

1.2 ESTRUTURA E REPLICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS

A partícula de adenovírus não possui envelope, tem simetria icosaédrica e tamanho médio de 90-100 nm, sendo o genoma viral composto por DNA fita dupla linear (Berk 2013). O capsídeo é formado por subunidades proteicas designadas capsômeros, sendo os capsômeros formados por três proteínas maiores, os hexons, os pentons e as fibras, e quatro proteínas menores, a IIIa, VI, VIII e IX. A estrutura do capsídeo é constituída de 240 hexons e 12 pentons. As vinte facetas do capsídeo são formadas por doze trímeros de proteínas dos hexons (Robinson et al. 2011, Reddy & Nemerow 2014).

Dos pentons (vértices do capsídeo) projetam-se fibras, cuja principal função é realizar a adsorção nas células alvo do hospedeiro, além de constituírem epítomos imunodominantes. Os hexons são também reconhecidos como determinantes antigênicos, importantes alvos de anticorpos neutralizantes (Hong et al. 1997, Rux et al. 2003, Berk 2013) (Figura 1).

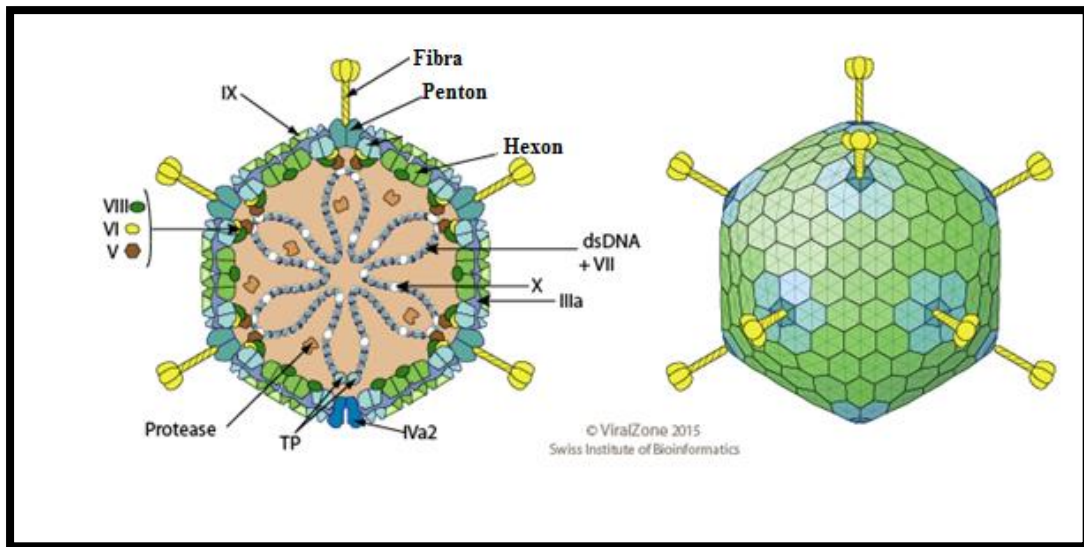


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral dos HAdVs. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/183.html. Acesso em 17-08-2016.

O core viral é composto por DNA linear envolto por um complexo de proteínas, constituído por seis proteínas V, VII, μ , IVa2, proteína terminal e protease. Estimativas estequiométricas indicam que a partícula de adenovírus possui massa total de 150 MDa, enquanto somente proteínas do core possuem massa entre 25 MDa (San Martín C, 2012) (Figuras 2).

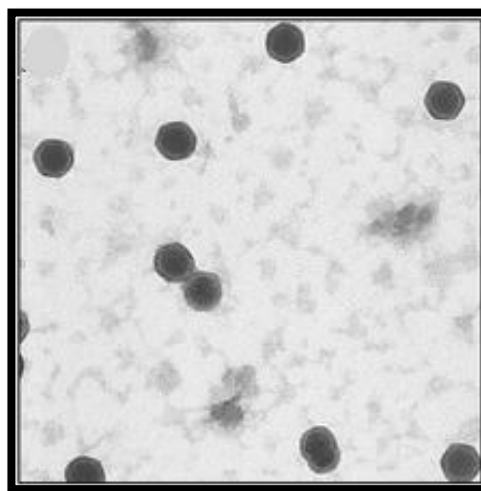


Figura 2. Micrografia representativa de uma partícula de adenovírus 5. (Adaptado de Varghese et al. 2004).

As proteínas menores desempenham papéis essenciais na desmontagem, na entrada celular, e montagem de novas partículas virais. (Reddy & Nemerow 2014, Condezo et al. 2015, Ortega-Esteban et al. 2015). As proteínas menores constituem ainda uma base para a proteína VI ligando-se aos fosfolipídios e auxiliando na lise da membrana celular, desempenhando seu principal papel na ruptura do endossoma (Greber et al. 2016). A proteína IX forma uma rede composta por quatro trímeros no centro de cada faceta, dando sustentação e estabilidade à partícula viral (Fabry et al. 2009).

O ciclo replicativo dos HAdVs se inicia com a adsorção da partícula viral a célula do hospedeiro possibilitando a entrada do vírus na célula alvo. A porção terminal das fibras se liga aos receptores celulares do hospedeiro, permitindo a adsorção da partícula viral à célula alvo (Robinson et al. 2011), e em seguida adentram nas células através da endocitose mediada por clatrina (Robinson et al. 2011, Fay et al. 2015). A penetração do vírus na célula alvo é necessária para se estabelecer uma infecção, sendo a adsorção das partículas virais um processo com duas etapas. No primeiro momento ocorre a ligação da partícula viral, através de seu domínio globular da fibra, ao CAR (Adenovírus Receptor), o receptor primário para a maioria dos adenovírus é o CAR uma proteína de adesão intercelular normalmente localizada na superfície basolateral de diversos epitélios, assim justificando o tropismo dos adenovírus por diferentes tecidos (Kotha et al. 2015), posteriormente os aminoácidos Arg-Gli-Asp (RGD) da base do penton interagem com as integrinas celulares $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ e $\alpha\beta 1$ que mediam a internalização dos HAdVs às células (Pozzuto et al. 2015).

Após a adsorção e penetração, as partículas virais, migram para núcleo por meio da rede de microtúbulos, onde se ligam ao complexo de poros nucleares e transferem o genoma viral para dentro do núcleo da célula hospedeira, com a finalidade de expressar genes virais (Leen et al. 2006).

A replicação dos HAdVs pode ser dividida em três fases: precoce, intermediária e tardia, de acordo com a ordem temporal de expressão dos genes, sendo fase precoce caracterizada pela expressão de genes precoces, processo que ocorre antes da replicação do DNA, a replicação do DNA ocorre na fase intermediária e a fase tardia após a replicação do DNA. Os produtos de genes da região precoce estimulam a célula a entrar na fase S do ciclo de divisão celular, seguida da replicação de DNA

viral na fase intermediária, com a síntese de proteínas estruturais virais. Na fase tardia ocorre a transcrição e tradução dos genes tardios envolvidos na replicação do genoma e montagem da partícula viral com consequente morte celular causada pela liberação de novas partículas (Kim et al. 2000, Fuchsova et al. 2015).

O genoma dos HAdVs possui cinco unidades de transcrição precoce E1A, E1B, E2, E3 e E4. Essas regiões são as primeiras regiões transcritas que codificam proteínas envolvidas na ativação das unidades de transcrição de outras regiões virais. As proteínas produzidas pela unidade E1A induzem atividade mitogênica na célula hospedeira e estimulam a expressão de outros genes virais. As proteínas produzidas pela unidade E2 mediam a replicação do DNA viral e também são transcritas na fase intermediária da infecção, e as proteínas E3 e E4 estão envolvidas com as interações com elementos do sistema imune do hospedeiro consideradas unidades de transcrição tardias. As unidades intermediárias produzem dois produtos intermediários. A proteína IX e a proteína IVa2 que desempenham papel no encapsidamento do DNA viral e montagem dos vírions (Meulenbroek et al. 2004, Saha et al. 2014, Ahi et al. 2015). A unidade de transcrição tardia, depois de processada, gera subsequentemente cinco classes de RNAm tardios (L1-L5) (Hofmayer et al. 2009, Berk 2013, Fonseca et al. 2014, Saha et al. 2014). A ativação da principal região promotora tardia (MLP) após o início da síntese do DNA viral permite a expressão dos genes tardios que codificam as proteínas estruturais. As regiões tardias (L1-L5) são transcritas a partir de processamento alternativo (Saha et al. 2014) (**Figura 3**).

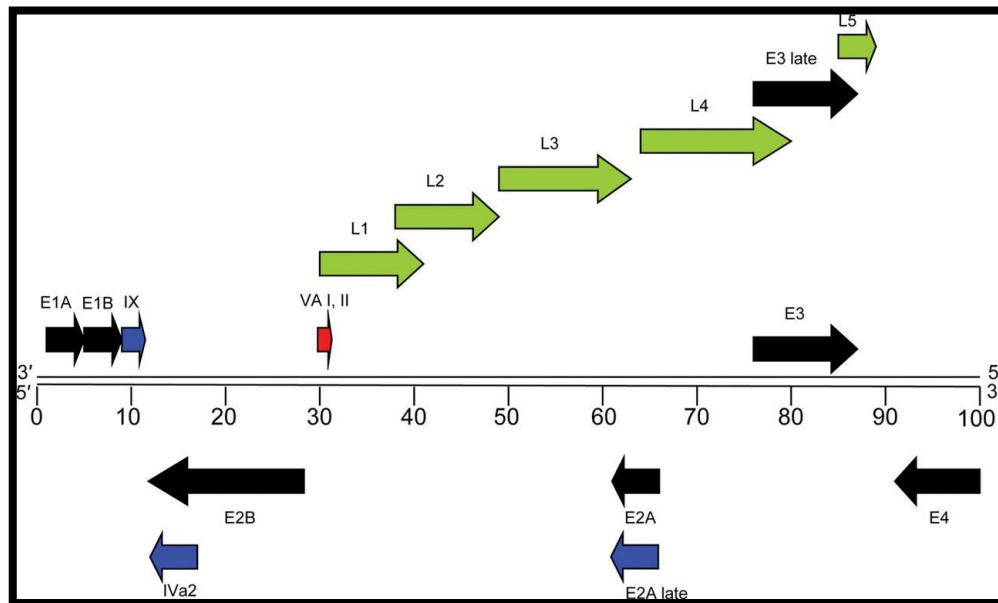


Figura 3. Representação esquemática do genoma dos HAdVs. (Adaptado de Hall et al. 2010).

1.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Como referido, as partículas de adenovírus não possuem envelope sendo altamente resistentes à inativação agentes químicos e físicos, podendo permanecer infecciosas à temperatura ambiente durante períodos prolongados, em média por até três semanas em fômites. Os HAdVs são sensíveis à inativação por alguns produtos químicos como os álcoois: etanol, isopropanol e n-propanol em concentração em torno de 70% ou produtos compostos por cloro (Cassir et al. 2014).

Os HAdVs são conhecidos por terem alta estabilidade e resistência em ambientes aquáticos quando comparados a outros vírus gastroentéricos, sendo frequente sua presença em esgotos e superfícies em todo mundo, podendo causar sérias implicações para a saúde pública. Surto de adenovírus com veiculação hídrica têm sido relatados também para os tipos não entéricos, sendo relatada vinculação hídrica de adenovírus causador de ceratoconjuntivite (Turston-Enriquez et al. 2003, Aslan et al. 2011, Pimenta et al. 2016).

O ácido clorídrico sintetizado e secretado pelas células parietais gástricas pode reduzir o potencial hidrogeniônico (pH) intraluminal para abaixo de duas unidades. Seguindo o trajeto de microorganismos entéricos, no intestino existem várias proteases e sais biliares que são secretados pelas células pancreáticas no duodeno e trato biliar, os íons de bicarbonato alteram o pH para 6, tais condições encontradas no trato gastrointestinal são altamente inóspitas para a viabilidade de alguns vírus. Vírus gastroentéricos devem ser estáveis ao ácido gástrico e resistente a inativação por sais biliares e enzimas proteolíticas provenientes do intestino. Os adenovírus gastroentéricos são resistentes às condições inóspitas do trato gastrointestinal e replicam-se no trato intestinal causando geralmente infecções autolimitadas (Armstrong 2004, Echavarria 2008).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS

Os vírus são patógenos que infectam o hospedeiro utilizando o maquinário celular, em maior ou menor extensão para se replicar, produzindo a progênie viral e estabelecendo a infecção no hospedeiro (Lam et al. 2010, Berk 2013).

A transmissão dos adenovírus humanos pode ocorrer pela via respiratória, via fecal-oral, contato com secreção ocular, contato com fômites, e ainda por transplante de órgãos infectados (CDC 2011, Wold & Ison 2013). Os HAdVs que adentram o organismo pela via respiratória, se replicando principalmente em células do epitélio respiratório não ciliado, como nas tonsilas e adenoides, além de poderem se replicar de forma limitada em linfócitos.

Ao penetrarem pela via fecal-oral os HAdV se replicam em células maduras das vilosidades do intestino delgado e são excretados nas fezes. A partir dos sítios primários de infecção, os adenovírus podem se disseminar para diversos órgãos ou tecidos do organismo (Wold & Ison 2013). Estima-se que o período de incubação dos adenovírus humanos seja de dois a quatorze dias, sendo a maioria das infecções caracterizadas como autolimitada (Ruuskanen et al. 1988, Heemsherk et al. 2006, CDC

2011). As principais síndromes clínicas em humanos associadas aos diferentes tipos de HAdVs estão apresentadas no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Associação entre os diferentes tipos de HAdV e quadros clínicos em humanos.

Espécie	Tipo	Síndromes clínicas em humanos
A	12,18,31,61	Infecções entéricas
B	3,7,11,14,16,21,34,35,50,55,66	Conjuntivite, doenças respiratórias, doença respiratória aguda, cistite hemorrágica, meningites
C	1,2,5,6,37	Infecções endêmicas, sintomas respiratórios
D	8,9,10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49, 51,53, 54,56,58-60, 63-70	Queratoconjuntivite (em imunocomprometidos)
E	4	Conjuntivite, doenças respiratórias
F	40,41	Gastroenterite
G	52	Gastroenterite

Adaptado de Berk 2013.

Alguns estudos têm sugerido que as infecções causadas por HAdVs podem resultar em quadros clínicos mais abrangentes e graves tais como obstrução crônica das vias aéreas, displasia pulmonar, miocardite e miocardiopatia dilatada, síndrome da mononucleose, morte súbita infantil e perinatal e até mesmo o desenvolvimento da obesidade. Algumas variantes dos HAdVs espécie B, espécie com maior variabilidade de manifestações clínicas, são associados a infecções oculares, respiratórias e do trato urinário (Gray et al. 2006, Dusátková et al. 2015, Lenman et al. 2015, Xu et al 2015).

Alguns subtipos virais podem ser considerados mais patogênicos que outros, provavelmente por possuírem uma maior virulência. Todos os aspectos relacionados a virulência e ao tropismo dos adenovírus não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que um dos fatores que resultam em diferentes graus de virulência ou tropismo celular do vírus, são os genes que codificam as proteínas da região E3 ou da fibra, que modulam a resposta imune e desempenham importante papel

na patogenicidade. Outros fatores predis põe os pacientes a infecções por HAdVs, são desnutrição, imunodeficiências ou outras infecções virais, determinam as manifestações dos sinais e sintomas levando pacientes a quadros clínicos graves nas infecções por HAdVs que podem evoluir para o óbito, principalmente em crianças (Carballal et al. 2002).

As coinfeções causadas por mais de um tipo de vírus respiratório são comuns na população infantil e têm sido reportadas, podendo representar um fator de risco para complicações como insuficiência aguda respiratória principalmente em crianças, coinfeções entre adenovírus e outros agentes virais ou bactérias em muitos casos, agravam o quadro clínico dos pacientes podendo causar morbidade e mortalidade nas populações infantis (Diaz et al. 2015). Coinfeções entre agentes virais entéricos ocorrem frequentemente em diversas regiões do mundo, os HAdVs associados a rotavírus, norovírus e bactérias, estão associados principalmente a quadros graves de desidratação, sendo causa comum em hospitalizações em todo mundo em crianças (Lopes-João et al. 2015, Finianos et al. 2016, Torres et al. 2016). Os rotavírus, norovírus, sapovírus, adenovírus, astrovírus, dentre outros, são importantes agentes etiológicos de gastroenterites virais (Tran et al. 2010), sendo os HAdVs principalmente associados à gastroenterite em lactentes e crianças menores de cinco anos de idade (Hamkar et al. 2010).

A importância do adenovírus como agente oportunista em indivíduos imunocomprometidos é conhecida, e vem sendo relacionada à doença respiratória aguda, ceratoconjuntivite e gastroenterite nessa população (Watanabe et al. 2013, Pauly et al. 2014). As infecções locais em indivíduos imunocomprometidos causadas por HAdVs podem evoluir, podendo causar disseminação se replicando em diversos órgãos, tais como fígado, pâncreas, glândulas adrenais, intestino e pulmões (Ganzenmueller & Heim 2011). A persistência e aumento progressivo da carga viral têm sido relacionados com a progressão da doença e eventualmente a morte, principalmente em indivíduos submetidos à transplantes (Heemsherk et al. 2005).

1.5 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS

Os adenovírus humanos podem infectar indivíduos de todas as idades, sendo principalmente detectados em amostras clínicas de crianças menores de cinco anos de idade (Ampuero et al. 2012). Como referido, neste grupo populacional, estes agentes podem causar uma variedade de síndromes clínicas, sendo mais comumente relatadas as do trato respiratório e gastroentérico (Lu MP et al. 2013, Lu X et al. 2013). Os HAdVs são agentes oportunistas que causam mortalidade e morbidade em crianças, por gastroenterites e doenças respiratórias (Echavarria 2008, Hendrickx et al. 2014). Estudos demonstram ainda que a hospitalização facilita a disseminação desses agentes em ambiente nosocomial (Cui et al. 2015).

Os HAdVs podem se disseminar de forma rápida em ambientes semifechados e com aglomeração de pessoas, sendo este um dos fatores determinantes da doença epidêmica em comunidades populosas (Puerari et al. 2015). A *World Health Organization* (WHO) estima que entre 2000 e 2003, aproximadamente 10,6 milhões de mortes precoces de crianças menores de cinco anos possam ser atribuídas a vírus como HAdVs, desta, 19% foram associadas à pneumonia, 18 % à diarreia (Bryce et al. 2005). Estima-se que os HAdVs causem cerca de 40 a 60% do total de infecções respiratórias virais em crianças, sendo essas comumente associadas aos HAdV dos tipos 1, 2 e 5. Os adenovírus dos tipos 4, 3, 7, 14 e 21 são frequentemente associados a infecções desencadeadoras de doenças respiratórias agudas graves que podem levar crianças ao óbito (Toth et al. 2015).

Como referido por Nguyen et al. (2007) a gastroenterite é responsável por 1,76 milhões de mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade, a cada ano em todo o mundo. Os HAdVs são uma das principais causas de epidemias de gastroenterite, além de importante causa de infecções esporádicas em crianças de diferentes partes do mundo, com prevalência que varia de 2 a 33 %, sendo as infecções causadas por HAdVs consideradas a terceira causa mais comum de gastroenterite viral em crianças (Kuypers et al. 2006, Sriwanna et al. 2013, Vetter et al. 2015).

Na Turquia, a frequência de positividade para rotavírus e adenovírus foi avaliada em amostras fecais de 596 pacientes, sendo os adenovírus identificados em

8,9% das amostras. Neste estudo foi ainda observado um índice de codetecção com outros vírus gastroentéricos de 4,4% (Akan et al. 2009).

Em um estudo conduzido em amostras provenientes de crianças com diarreia aguda, foi reportada positividade para adenovírus em 3,6% das crianças, menores de cinco anos, com diarreia aguda, em Campo Grande, na região Centro-Oeste (Andreasi et al. 2008).

No Rio Grande do Sul, DNA de HAdV foi detectado em 33% de 147 amostras de fezes analisadas de pacientes sem sintomas de diarreia durante o Verão e Inverno, no Rio Grande do Sul, Brasil (Vetter et al. 2015). No Paraná, região sul do Brasil, o índice de positividade de HAdV em 225 amostras de fezes foi de 16%, demonstrando maior índice de positividade, quando comparado aos rotavírus e norovírus com índices de 6 e 8%, respectivamente (Raboni et al. 2014). O quadro 2 demonstra algumas características de estudos que objetivaram a pesquisa de HAdVs em amostras de fezes e do trato respiratório da população infantil.

Em um estudo conduzido em amostras de aspirado nasofaríngeo com 760 crianças hospitalizadas em São Paulo, foi observado índice de positividade de 27% para adenovírus, sendo que mais de 70% da população era composta por crianças de até 12 meses de idade (Durigon et al. 2015).

Na China os HAdVs são responsáveis por infecções respiratórias graves, podendo ocorrer incidência variável de acordo com a região do país, no estudo de Li et al. (2015) que avaliaram a incidência de HAdVs na região norte e na região leste da China (Quadro 2), os HAdVs foram detectados em 20,1% e 8,2% respectivamente.

Alguns estudos demonstram que a elevada incidência de HAdVs, está estreitamente relacionada com sintomas respiratórios, principalmente em crianças, sendo a frequência desses vírus pode variar de 1 a 20%, dependendo da população alvo, amostra clínica e metodologia utilizada para detecção viral (Li et al. 2015, Sriwanna et al. 2013).

Quadro 2- Características epidemiológicas e índices de detecção na população infantil em diferentes países do mundo

LOCAL	FAIXA ETÁRIA	METODOLOGIA	ÍNDICE DE POSITIVIDADE	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Tailândia	0-3 Anos	PCR	1,00%	Aspirado nasofaríngeo	Sriwanna et al. 2013
China	<2 Anos	PCR	20,1 e 8,2%	Aspirado nasofaríngeo expectoração	Li et al. 2015
Gabão	<5 Anos	MULTIPLEX PCR EM TEMPO REAL	19,6%	Fezes	Lekana-Douki et al. 2015
Estados Unidos	<5 Anos	PCR EM TEMPO REAL	3,2%	Lavado nasal e <i>swab</i> , Secreção traqueal, Lavado broncoalveolar	Kuypers et al. 2015
Irã	<5 Anos	PCR	14%	Fezes	Khosdhel et al. 2015
Qatar	0-84 Anos	TEMPO REAL	6,2%	Fezes	AL-Thani et al. 2013
Brasil	<6 Anos	NESTED-PCR	2%	Fezes	Amaral et al. 2015
Brasil	0-24 Meses	PCR em TEMPO REAL	16%	Fezes	Raboni et al.2014
Brasil	<24 Meses	PCR	2%	Aspirado nasofaringeano	Pilger et al.2011

Sriwanna et al. (2013) reportaram índice de positividade de 1,4% para HAdV em amostras de swab nasal e de 5,8% em amostras fecais, coletadas entre 2009 a 2012, em crianças de 0 e 14 anos de Bangucoque por PCR convencional. Os índices de positividade encontrados em estudos conduzidos em outros países asiáticos, tais como a China foram de 0,9% (Ren et al. 2009), e Malásia 1,8% (Abd-Jamil et al. 2010), bem como índices um pouco mais elevados em países como Canadá 7,7% (Yeung et al. 2009), Peru 5% (Ampuero et al. 2012) e Colômbia 5% (Rojas et al. 2011) (Sriwanna et al. 2013).

Dessa forma estudos que tenham como objetivo a avaliação do perfil epidemiológico em diferentes populações, com ênfase na caracterização molecular e determinação da carga viral em associação a sintomas clínicos, são determinantes para um melhor entendimento do padrão de circulação desses agentes, bem como auxiliar na tomada de medidas preventivas e terapêuticas futuras.

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS

O diagnóstico das infecções por adenovírus pode ser realizado por diferentes metodologias que incluem várias técnicas, atualmente podem ser aplicadas não só para o diagnóstico clínico, mas também para pesquisa. Essas técnicas são baseadas em princípios diferentes os quais remetem ao isolamento viral em cultura de células, detecção de antígenos virais, e detecção e/ou caracterização de regiões parciais do genoma viral por métodos moleculares (Echavarria 2008).

As amostras clínicas de escolha para o diagnóstico variam de acordo com os sintomas apresentados pelos pacientes, podendo ser utilizadas secreções respiratórias e de conjuntiva, fezes, soro, além de material de biópsia (Ghebremedhin et al. 2014).

O método padrão ouro indicado para a pesquisa de adenovírus é a detecção viral pós-cultivo celular, podendo se identificar o vírus através da observação de efeito citopático característico observado em um período de dois a cinco dias. Porém o uso da cultura de células como método diagnóstico para adenovírus 40 e 41 é bem discutido devido ao pobre crescimento comparando a outros adenovírus por se tratar de tipos fastidiosos. Após o cultivo os vírus podem ser identificados por

imunofluorescência (IF), ensaio imunoenzimático (EIE), além de métodos moleculares com PCR e PCR em tempo real (Tiemessen et al. 1994, Ko et al. 2003, Dey et al. 2011).

A microscopia eletrônica pode ser aplicada de duas formas na pesquisa de adenovírus, podendo ser utilizada em amostras provenientes da replicação em cultura ou de forma direta a partir do espécime clínico. A vantagem de utilizar essa metodologia é que ela permite a observação da morfologia do adenovírus, sendo um método relativamente rápido, porém de baixa sensibilidade, por permitir visualização das partículas virais somente quando essas se encontram em grande número, a partir de 10^6 partículas virais por mL de amostra (Osborne et al. 2015, Wold & Ison 2013).

A imunocromatografia e o EIE são métodos que possibilitam a detecção de antígenos virais, podendo utilizar em vários tipos de amostras, geralmente utiliza-se a proteína do hexon como antígeno em ensaios para detecção de anticorpos de adenovírus. A imunocromatografia que fornece resultados rápidos, evitando contaminação de outras amostras, de fácil manejo e custo (Kim et al. 2014).

A imunofluorescência direta (IFD) em conjunto com o isolamento viral em cultura de células eram os métodos mais utilizados para detecção de vírus respiratórios como HAdVs, porém o uso de metodologias moleculares tem ganhado espaço nas instituições e laboratórios de pesquisas para detecções de agentes virais (Puerari et al. 2015).

Ensaio moleculares, como a Reação em Cadeia Pela Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* -PCR), constituem ferramentas valiosas para a pesquisa viral, devido a sua alta sensibilidade e especificidade para a pesquisa de regiões parciais do genoma do vírus, determinação da carga viral, e uso de pouco volume de amostras clínicas não comprometem a eficiência do ensaio. Sua aplicação no diagnóstico clínico tem aumentado significativamente nos últimos anos, seguida de sequenciamento genômico e análise filogenética (Sadeghi et al. 2011, Berk 2013, Lin et al. 2015). Existem alguns PCR, tais como: PCR convencional, PCR multiplex, nested-PCR, PCR em tempo real. A reação em cadeia pela polimerase multiplex é um formato que utiliza mais de um par de iniciadores, podendo detectar simultaneamente diferentes espécies virais, diferentemente a nested-PCR é um teste que utiliza o produto da PCR convencional, com iniciadores com alvos internos de regiões conservadas geralmente do gene que codificam para a proteína do hexon ou penton, aumentando a sensibilidade do teste (Puig et al. 1994, Xagorarakis et al. 2007). Regiões

alvos mais variáveis do genoma viral podem também ser utilizadas para determinar a variabilidade genética dos adenovírus.

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real ou PCR quantitativo (Real-time PCR) permite identificar todos os tipos de adenovírus descritos, dependendo do desenho dos iniciadores e sonda, sendo um teste muito sensível, consideravelmente rápido, menos passível de contaminações e que permite ainda a quantificação do genoma viral, porém a metodologia é de alto custo para amplo uso na prática clínica (Sarantis et al. 2004, Bil-Lula et al. 2012).

O Sequenciamento genômico constitui importante ferramenta para a caracterização dos diferentes tipos de HAdV, além de vírus recombinantes. As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas “de nova geração”, começaram a ser disponibilizadas comercialmente em 2005 e estão evoluindo em um curto prazo de tempo. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (Carvalho & da Silva et al. 2010). O Sequenciamento tem sido utilizado com frequência na identificação e caracterização genômica das variantes de HAdV e outros agentes virais. Para os adenovírus as regiões sequenciadas são usualmente as regiões codificantes da fibra, base do penton e hexon (Hiroi et al. 2013, Wang et al. 2016).

1.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELOS ADENOVÍRUS

A transmissibilidade dos HAdVs pode ser reduzida com uso de medidas básicas de higiene pessoal e educação, saneamento básico. Entretanto não são suficientes para a total eliminação viral. Em geral, as medidas profiláticas educam a população a evitar a vinculação de vírus pelas vias de transmissão do agente, tais como lavar bem as mãos, evitar contato das mãos nas mucosas oral, nasal e conjuntiva dos olhos, evitar tossir e espirrar em proximidade a outros indivíduos, e evitar contato com doentes, principalmente em ambientes nosocomiais que são fechados e vinculadores desses agentes (CDC 2011).

Uma vez que o programa de vacinação foi interrompido os casos de doenças respiratórias causadas por Ad4 e Ad7 aumentaram em militares e, em 2001, os esforços para restabelecer o programa de vacina foram iniciados (Weaver EA 2014).

Nos Estados Unidos licenciaram, em março de 2011, para uso somente em militares, uma vacina oral composta por vírus atenuados que imuniza contra os sorotipos 4 e 7 (CDC 2011).

O tratamento atualmente disponível para infecções por adenovírus inclui fármacos antivirais como a ribavirina, cidofovir e imunoterapia (Rutella & Lotelli 2011), o tratamento profilático com o valganciclovir é principalmente indicado para o tratamento de pacientes de alto risco como os imunocomprometidos, tais como pacientes transplantados (Toth et al. 2015, Wold & Toth, 2015), entretanto não é indicado uso desses fármacos para a população em geral.

2 JUSTIFICATIVA

Os HAdVs são vírus com perfil de amplo de quadros clínicos em diferentes populações, podendo ser detectados em diversos espécimes clínicos. São importantes agentes causais de infecções do trato respiratório e gastroenterites, principalmente em crianças de diferentes partes do mundo (Chen et al. 2016, Dashti et al. 2016).

As infecções respiratórias agudas do trato inferior são uma das principais causas de hospitalizações em lactentes e crianças em todo mundo. Em crianças, as infecções agudas respiratórias causadas por HAdVs são frequentes e podem evoluir para o acometimento do trato respiratório inferior podendo resultar em pneumonia e, eventualmente ao óbito (Tang et al.2011). Em países desenvolvidos e em desenvolvimento gastroenterites virais são causa comum de hospitalizações de crianças podendo, ocasionalmente, levar a quadros de desidratação grave (Cebey-López et al. 2015, Ozsari et al. 2016).

As altas taxas de morbimortalidade em crianças no mundo por doenças respiratórias e gastroentéricas, além da escassez de dados sobre a frequência, carga viral e tipo de adenovírus, em diferentes tipos de amostras clínicas de uma mesma criança, em associação com a sintomatologia apresentada refletem a relevância do presente estudo.

Espera-se que este trabalho possa auxiliar no maior esclarecimento do perfil epidemiológico das infecções causadas por HAdVs em crianças em Goiânia, Goiás, além de demonstrar características clínicas associadas a sintomatologia da população. Ao nosso conhecimento nenhum trabalho foi realizado em Goiânia, Goiás envolvendo crianças com e sem sintomas de GEA e ou respiratório com objeto de pesquisa a associação entre positividade, idade, carga viral e sintomatologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Pesquisar adenovírus humanos em amostras clínicas obtidas de crianças, com até cinco anos de idade, com ou sem sintomatologia de gastroenterite e/ou doenças respiratórias atendidas no Hospital Materno Infantil, em Goiânia, Goiás.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar HAdV em amostras fecais e de *swab* respiratório da referida população;
- Caracterizar o tipo de adenovírus e determinar a carga viral das amostras analisadas;
- Avaliar a existência de possíveis associações entre a frequência, carga viral e tipo de adenovírus presente nas amostras positivas com a sintomatologia das crianças participantes do estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO E MATERIAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, de corte transversal. Participaram do estudo 200 crianças, com idade entre zero e cinco anos, atendidas no Hospital Materno Infantil, entre março de 2014 e julho de 2015. As crianças foram divididas em dois grupos: o primeiro composto por (N =129) crianças que apresentavam sintomas de gastroenterite aguda (diarreia, dor abdominal ou vômito, acompanhados ou não de febre) e/ou sintomas de doença respiratória (dispneia/chiado, tosse, acompanhados ou não de febre), e o segundo (N=71) com crianças que não apresentavam sintomatologia característica de gastroenterite aguda ou de doença do trato respiratório.

O Hospital Materno Infantil é referência estadual em urgência e emergência nas áreas da saúde infantil e maternal no Estado de Goiás, com enfoque na humanização da assistência integral a crianças e mulheres atendendo a população desde 1972.

Como critério de inclusão no estudo, foi determinado que crianças com até cinco anos de idade divididas em dois grupos, um de crianças com sintomas e o outro sem sintomas gastroentéricos ou respiratórios, que foram admitidas ao Hospital entre maio de 2014 e julho de 2015 e das quais tivessem sido possíveis coletar dois tipos de amostras (fezes e *swab* nasofaríngeo) seriam incluídas no estudo. A coleta do material de estudo (fezes e *swab* nasofaríngeo) foi realizada somente mediante autorização prévia concedida através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes ou responsáveis legais. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (Anexo I).

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

As amostras de fezes foram coletadas em frascos coletores estéreis e estocadas a 4°C até serem transportadas (em no máximo duas horas) para o laboratório de Virologia/IPTSP/UFG, onde foram processadas para a obtenção de uma suspensão fecal a 20% (em tampão salina fosfato pH 7,4). As suspensões homogeneizadas e

clarificadas por centrifugação a 120 x g por sete minutos, e os sobrenadantes recolhidos e estocados a -20°C até o momento do uso.

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO TRATO RESPIRATÓRIO

As amostras do trato respiratório foram obtidas por meio de *swabs* nasofaríngeanos, a coleta foi realizada por um profissional habilitado coletou amostras utilizando *swab* nasofaríngeano e armazenou o produto em tubo estéril fechado adequadamente, conservados e transportados refrigerados (gelo 4° a 8°C) até o Laboratório de Virologia/IPTSP/UFG, sendo imediatamente processadas, armazenadas em tubos estéreis contendo três ml de Meio Mínimo Essencial MEM (Grand Island, USA) , homogeneizado em vortex e centrifugado a 227 X g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado em alíquotas e estocadas à -80⁰ C.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

4.4 .1 Amostras de fezes

O DNA viral foi extraído a partir de suspensão fecal a 20%, utilizando kit comercial e seguindo as instruções do fabricante, (Qiamp Viral RNA Mini Kit da Qiagen). Inicialmente foram pipetados 560 µL do tampão AVL em 140 µL da suspensão fecal, incubação por 10 minutos a temperatura ambiente (15°C-25°C), seguido de centrifugação (6.000 g por 1 minuto). As amostras foram então pipetas em colunas contendo membrana de sílica e foram centrifugadas, adicionou-se 500µL de cada tampão (AW1 e AW2) seguindo de centrifugação (20.000 g por 2 minutos). As amostras foram eluídas em 60µL do tampão de eluição (AVE) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.2.2 Amostras do trato respiratório

O DNA viral foi extraído a partir de 200 µL de cada amostra utilizando kit comercial (Qiamp cadour Pathogen Mini Kit), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foram adicionados a cada amostra, 20 µL de proteinase K e adicionou

100 μL do tampão VXL, incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugou brevemente (6.000 g e por 1 minuto). Foram adicionados 300 μL do tampão ACB, seguido de centrifugação e o lisado foi então transferido para a mini coluna, seguido de breve centrifugação (6.000 g por 1 minuto). Foi então adicionado a cada coluna 600 μL do tampão AW1, centrifugado e adicionado 600 μL do tampão AW2, após outra etapa de centrifugação (20.000 g por 2 minutos) foi adicionado o tampão AVE para eluição das amostras que foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

4.5 PESQUISA DE HAdV E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL TaqMan (qPCR)

Para a pesquisa e determinação da carga de HAdV nas amostras de fezes e do trato respiratório por qPCR, foi inicialmente, construída uma curva padrão a partir de diluições seriadas (10^3 a $10^7/10\mu\text{L}$) do plasmídeo (pBR322), contendo como inserto a região do hexon do adenovírus, sendo o resultado expresso em cópias genômicas por mililitro (CG/mL). Para validação da curva foram observados os parâmetros coeficiente de correlação R ($\sim 0,99$) e eficiência da reação (88-116). Amostras com *cycle threshold* < 38 foram consideradas positivas (**Figura 4**).

Para a determinação da presença de inibidores foi utilizado um controle interno (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent, Applied Biosystems).

A reação consistiu na adição de $1\mu\text{L}$ de DNA a um volume de reação de $19\mu\text{L}$, volume final de $20\mu\text{L}$, contendo 1x de Universal Master Mix (Applied Biosystems), $0,9\mu\text{M}$ de cada iniciador (primeira região do hexon) F 5'-(CATTACATGCACATCGTCCGGG-3') e R (5'-CAGC GGG CGAA ACTT GCA CCA G-3') e $(0,225\mu\text{M})$ de sonda *TaqMan*: HAdV F (5'-CWTACATGCACATCKCSGG-3') para sonda foi usado HAdV R (5'-CRCGGGCRAAYTGCAACCAG -3') (Hernroth et al. 2002) $2\mu\text{L}$ do controle interno (10x Exo IPC mix) $0,4\mu\text{L}$ do DNA (50x Exo IPC).

O programa de ciclagem foi de 50°C por 1 min, 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, com coleta de dados na última

temperatura, conforme protocolo descrito por Hernroth et al. 2002, com adaptações. As amplificações foram feitas no aparelho (Biorad iQ-5).

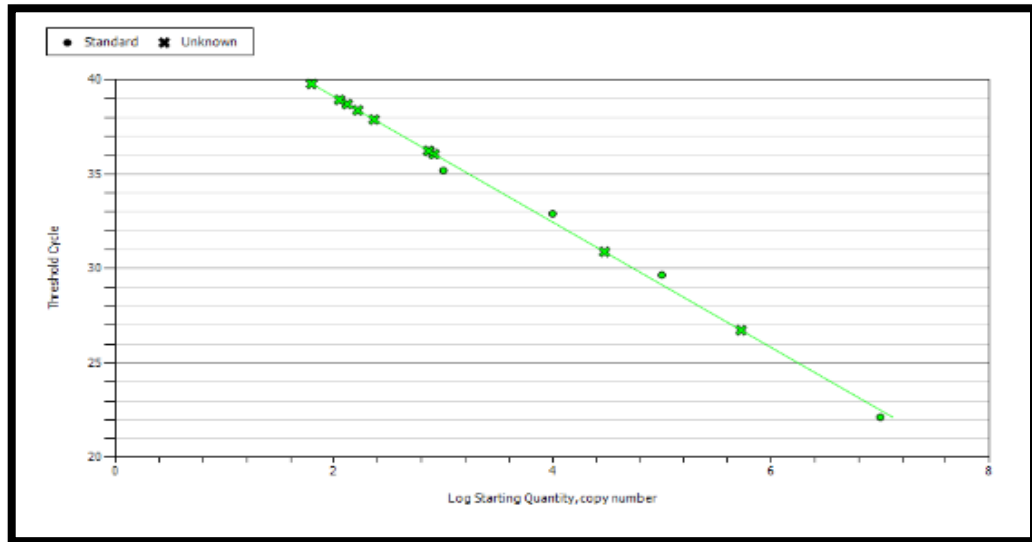


Figura 4. Gráfico representativo de uma corrida de qPCR. Os círculos representam pontos da curva padrão e as cruzes representam amostras de swab da população estudada.

4.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a caracterização molecular, as amostras positivas com concentração suficiente de DNA foram submetidas ao sequenciamento genômico e foram submetidas a um PCR convencional. As amostras foram amplificadas utilizando iniciadores para as regiões hipervariantes (HVR-7) do hexon dos HAdVs, que flaqueiam uma região de 605-629 nucleotídeos, e posteriormente as amostras foram purificadas. (Sarantis et al. 2004) (5'CTG ATG TAC TAC AAC AGC ACT GGC AAC ATG GG 3')

Foi realizada utilizando-se BigDye Terminator versão 3.01 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada reação de sequenciamento, empregou 10 µL do DNA purificado e uma mistura contendo 3 ou 1 µL de água MilliQ, 2 µL de tampão 5X, 1 µL de primer (2 pmol) e 1µL de Big Dye (o qual possui didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) com marcadores fluorescentes, dNTPs e Taq DNA polimerase).

Em seguida, as amostras foram precipitadas utilizando isopropanol a 65% seguido de etanol a 60% para a retirada dos ddNTPs não incorporados. Após centrifugação, o etanol foi retirado e a placa colocada em termociclador para completa secagem (2 minutos a 95°C).

Adicionou-se 10 µL de formamida Hi Di (Applied Biosystems) às amostras, e a placa foi colocada em termociclador durante 5 minutos a 95°C para desnaturação da fita de DNA. Imediatamente após, as amostras foram colocadas em gelo por dois minutos, e a placa levada para o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para a leitura dos eletroferogramas.

Para análise das sequências obtidas montou-se uma sequência consenso das fitas sense e antisense utilizando a interface phred/phrap (Ewing et al. 1998, Gordon et al. 2001) por meio do site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Posteriormente, foi feito o alinhamento das sequências consenso de cada amostra com a utilização do programa Clustal X (Larkin et al. 2007), juntamente com sequências protótipos de cada genótipo de HAdVs obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para edição do alinhamento utilizou-se o programa BioEdit.

A árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0 (Kumar et al. 2015). As análises foram realizadas pelo método Neighbor-Joining, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros e sendo consideradas 1000 replicatas e valores *bootstraps* acima de 80%.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa *Epi Info* versão 7.0, para análise univariada, como o teste de χ^2 , sendo que valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

A população de estudo foi composta por 200 crianças, com até cinco anos de idade com ou sem sintomas de gastroenterites aguda e manifestações de infecções respiratórias, atendidas no Hospital Materno Infantil, localizado em Goiânia, Goiás.

Das 200 crianças participantes do estudo, 113 eram do sexo masculino e 87 do sexo feminino. A maioria das crianças (82,5% -165/200) tinha idade entre sete dias a 24 meses, 20% (35/200) com idade até 60 meses, sendo a idade média da população estudada de um ano e 34 dias. Foi observado um índice de positividade global (positividade nas fezes ou *swab*) para adenovírus de 21% (42/200), sendo a positividade para HAdVs em amostras de fezes de 16% (32/200) e em *swab* nasofaríngeo de 9,5% (19/200). Ainda, 21,4% (9/42) das crianças apresentaram DNA viral em ambos tipos de amostras clínicas. A tabela 1 representa as características da população de estudo em relação à positividade para HAdV.

Tabela 1 - Características da população em relação à positividade para adenovírus

Características	N (%)
Idade (meses)	
0-24	35/165 (21,2%)
<24	7/35 (20%)
Sexo	
Masculino	26/113 (23,0%)
Feminino	16/87 (18,3%)
Positividade Global	
Fezes	32/200 (16%)
Swab	19/200 (9,5%)
Período	
Seca	26/107 (24,3%)
Chuvoso	25/93 (26,8%)
Sintomas	
GEA e/ou Respiratório	28/129 (21,7%)
Assintomáticos	14/71 (19,7%)
Total de crianças positivas/Total de crianças	42/200 (21%)

Quanto à positividade para HAdV em relação ao sexo das crianças, foi observado índice de 23% entre crianças do sexo masculino e de 18,4% entre crianças do sexo feminino sem diferenças estatísticas. Em relação à idade maior índice de

positividade para HAdV foi observado em amostras de crianças entre 0-24 meses (21,2%), 20% em crianças com idade superior a 24 meses, esses dados estatisticamente significativos ($\chi^2=0,02$ p=0,87).

As crianças com algum sintoma de gastroenterite (dor abdominal, diarreia ou vômito) representavam 81,4% (105/129) da população sintomática. Dessas, 21% (22/105) foram positivas para HAdV em fezes, analisando associação entre pacientes com sintomatologia de GEA e positividade em amostras fecais observamos relação com dados estatisticamente significativos ($\alpha=0,04$) (**Tabela 2**). Foi ainda observado que 83,7% (108/129) das crianças sintomáticas possuíam um ou mais sintomas respiratórios. Quando analisamos a positividade para HAdV em amostra de *swab* nasofaríngeo, observamos que 9,2% (10/108) das crianças com algum sintoma respiratório eram positivas para HAdV, estabelecendo associação entre pacientes com sintomas respiratórios e positividade não foi observado dados significativos ($\alpha=1,0$) (**Tabela 2**).

Com relação à positividade de crianças assintomáticas para HAdV, 19,7% (14/71) delas foram positivas para HAdV, sendo que 50% (7/14) foram positivas nas fezes e 50% (7/14) no *swab* nasofaríngeo, dados de positividade em crianças assintomáticas e sintomáticas não apresentaram relação estatística ($\chi^2=0,66$ p=0,41).

Tabela 2 - População estratificada de acordo com a sintomatologia e positividade para adenovírus em amostras de fezes e *swab* nasofaríngeo.

Sintomatologia/Amostra Clínica	N	Positividade p/ HAdVs	p/α
Sintomas Gastroentéricos	129	105 (81,4%)	$\alpha=0,04$
Positividade em <i>swab</i> nasal	105	11 (10,4%)	
Positividade em fezes	105	22 (21%)	
Sintomas Respiratórios	129	108 (83,7%)	$\alpha=1,0$
Positividade em <i>swab</i> nasal	108	10 (9,2%)	
Positividade em fezes	108	19 (17,%)	
Assintomáticos	71	14 (19,7%)	p=0,41
Positividade em <i>swab</i> nasal	14	7 (50%)	
Positividade em fezes	14	7 (50%)	

Analisando a circulação de HAdVs durante o período de um ano, considerando-se os índices pluviométricos, detectou-se a circulação de HAdV durante as duas estações, seca (maio a setembro) e chuvosa (outubro a abril). Entretanto, não foi detectada positividade em março de 2015 e em agosto de 2014 em amostras fecais, e em janeiro e março de 2015 em amostras de *swab* nasofaríngeo.

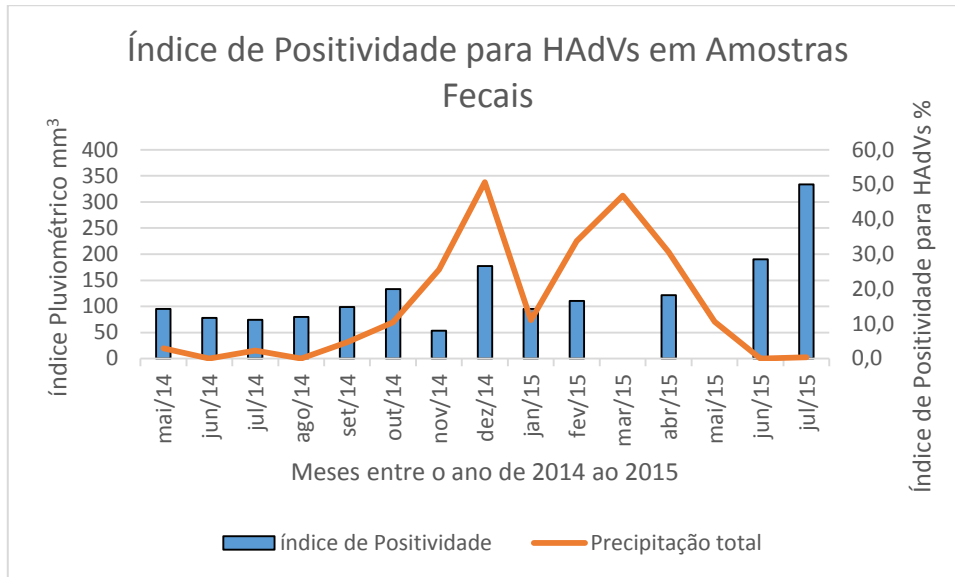


Gráfico 1. Gráfico representativo da distribuição do índice de positividade para HAdVs em amostras fecais com relação a dados pluviométricos (mm^3) no período do estudo.

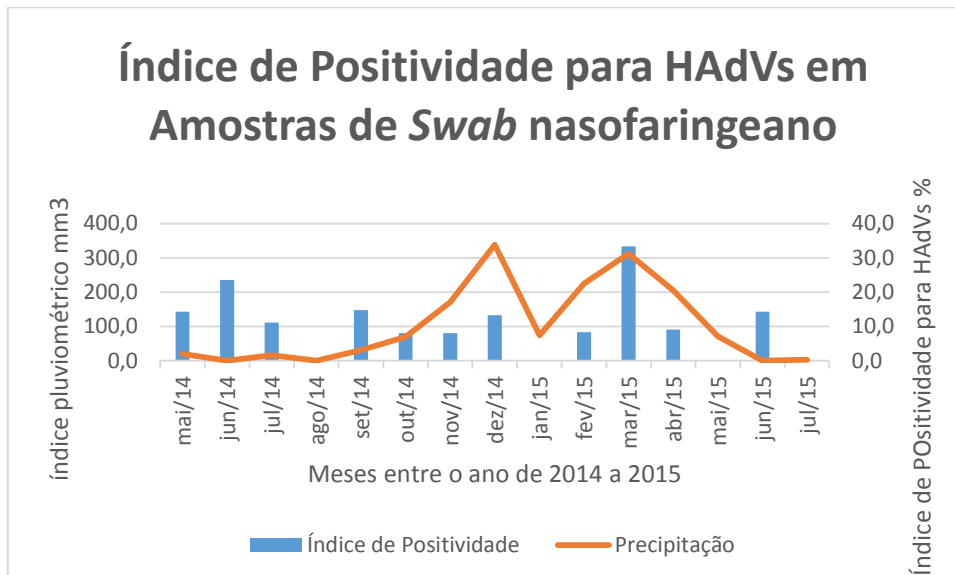


Gráfico 2. Gráfico representativo da distribuição do índice de positividade para HAdVs em amostras de *swab* nasofaríngeo em relação aos índices pluviométricos (mm^3) no período do estudo.

Durante o estudo a temperatura entre o mês de maio de 2014 a julho de 2015 variou de 29,75 a 35,5 ° C, a umidade relativa do ar durante o período de coleta de amostras do estudo variou de 37,12 a 75,94 mm³, a positividade para HAdV (tanto em amostras fecais quanto em *swab* nasofaríngeano) em meses de seca foi 24,3% (26/107) e em meses de chuva foi de 26,8% (25/93). Não sendo observadas diferenças significativas na positividade global, em relação às estações secas e chuvosas. ($\chi^2=0,02$, $p=0,86$). Dentre as 21 amostras positivas na estação de seca 11 eram provenientes de amostras de *swab* nasofaríngeano (52,3%), não sendo observada associação entre as variáveis descritas ($\chi^2=0,21$; $p=0,64$), dentre as 25 amostras positivas na estação de chuva 15 eram amostras fecais (60%), não foi observado dados significativos ($\chi^2= 0,25$; $p=0,25$) (**Gráficos 1 e 2**).

As cargas virais de HAdVs nas amostras clínicas variaram de $7,02 \times 10^8$ a $1,88 \times 10^{14}$ cópias/g por mL ou g de amostra clínica, com média de carga viral total de $1,48 \times 10^{13}$ (**Figura 5**). As amostras fecais tiveram média de carga viral de $1,57 \times 10^{13}$ cópias/g de fezes, as amostras de *swab* nasofaríngeano possuíam carga viral média de $8,79 \times 10^{11}$ cópias/mL.

As amostras dos pacientes assintomáticos apresentaram cargas virais que variaram de $7,02 \times 10^9$ a $4,22 \times 10^{12}$ cópias/g ou mL, com média de $6,42 \times 10^{11}$ cópias/g ou mL de amostra clínica. Ao analisar dados de cargas virais obtidos através do qRT-PCR deste estudo, foi observado que uma amostra fecal apresentou um log a mais que todas as amostras de *swab* nasofaríngeano, em geral as cargas virais mais altas foram observadas com maior frequência em amostras fecais se comparadas com as cargas virais em amostras de *swab* nasofaríngeano.

Dentre as nove crianças positivas para HAdVs em ambas as amostras clínicas, 66,6% (6/9) apresentaram sintomas gastroentéricos e respiratórios, sendo que 77,7% (7/9) destas apresentaram carga viral superior a 10×10^{10} cópias/mL.

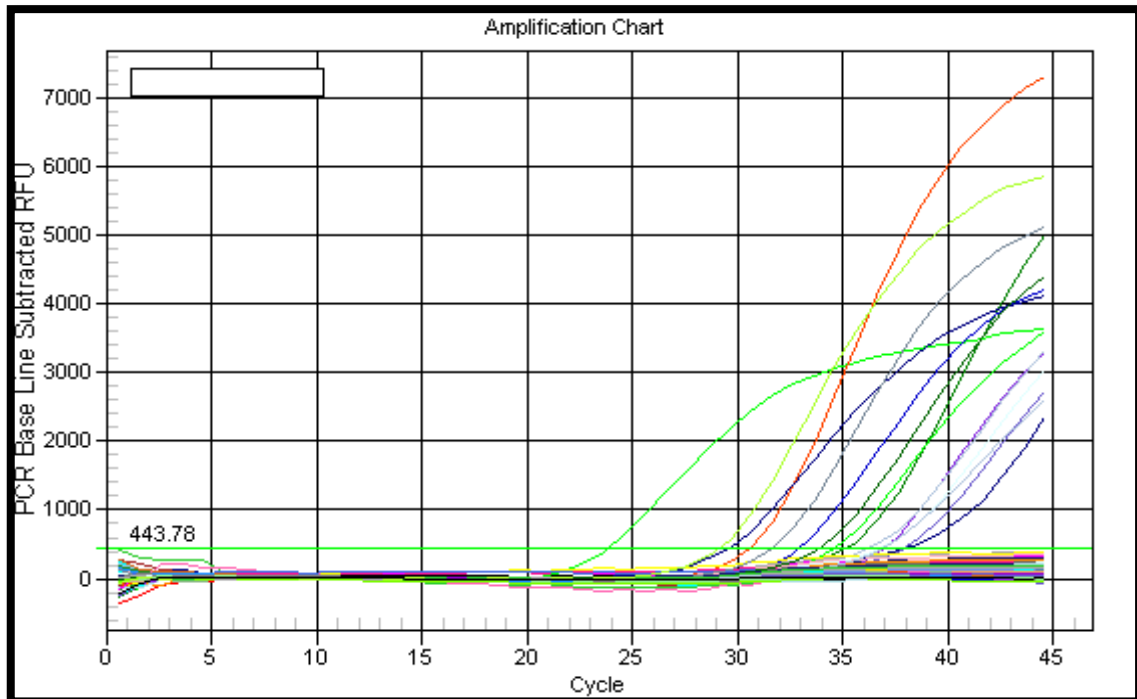


Figura 5. Gráfico representativo de uma corrida de qPCR com a curva padrão de amostras fecais de crianças assintomáticas participantes do estudo.

Treze amostras detectadas com cargas virais acima de $\log 12$ e, portanto, quantidade suficiente de DNA, foram submetidas ao sequenciamento genômico e purificação. Dessas, doze eram amostras de fezes e uma amostra de *swab* nasofaríngeo, entretanto a amostra de *swab* nasofaríngeo apresentou grande perda de DNA viral durante o processo de purificação inviabilizando posterior análise filogenética da mesma. Das treze amostras, cinco foram caracterizadas como espécie F tipo 41, e uma amostra foi caracterizada como espécie B tipo 3 HAdV todas provenientes de amostras fecais. A amostra caracterizada como tipo 3 de HAdVs não apresentou boa qualidade.

As amostras com qualidade suficiente para serem analisadas eram dos pacientes 93, 194, 196, 222 e 293. O paciente 93 tinha um mês de idade, do sexo masculino, não apresentava sintomas e foi detectado carga viral de $1,57 \times 10^{12}$, o paciente 194 possuía um ano de idade, do sexo feminino, assintomático, foi detectado carga viral de $2,07 \times 10^{11}$, o paciente 196 tinha dois anos de idade, era do sexo feminino apresentava sintomas de gastroenterites, apresentou carga viral de $1,88 \times 10^{14}$, o paciente 222, sexo masculino, possuía 9 meses de idade e demonstrou sintomas de gastroenterites e respiratórios, foi detectado carga viral de $9,81 \times 10^{12}$ e o paciente 293

do sexo masculino, tinha 11 meses de idade, apresentava sintomas de gastroenterite e respiratórios, com carga viral de $3,70 \times 10^{13}$.

As amostras positivas para HAdVs com identidade nucleotídica entre 98-100% foram designadas haplótipos, das cinco sequências de qualidade duas foram escolhidas para representarem as demais sequências similares e estas duas sequências haplótipos foram depositadas no GenBank. O haplótipo 1 representa as amostras 93,194 e 222 (nº de acesso: KY052790) e o haplótipo 2 representa as amostras 196 e 293 (nº de acesso: KY052791) (**Figura 6**).

Ainda com relação à análise das sequências obtidas, foi possível observar uma inserção de três nucleotídeos 1355- 1357 bp (aa 451) na sequência das amostras representadas pelo haplótipo 1, após o alinhamento das sequências com uma sequência completa do hexon extraído do GenBank nº de acesso AB330082. A região em que apresentou uma inserção de nucleotídeos está localizada no loop dois no hexon.

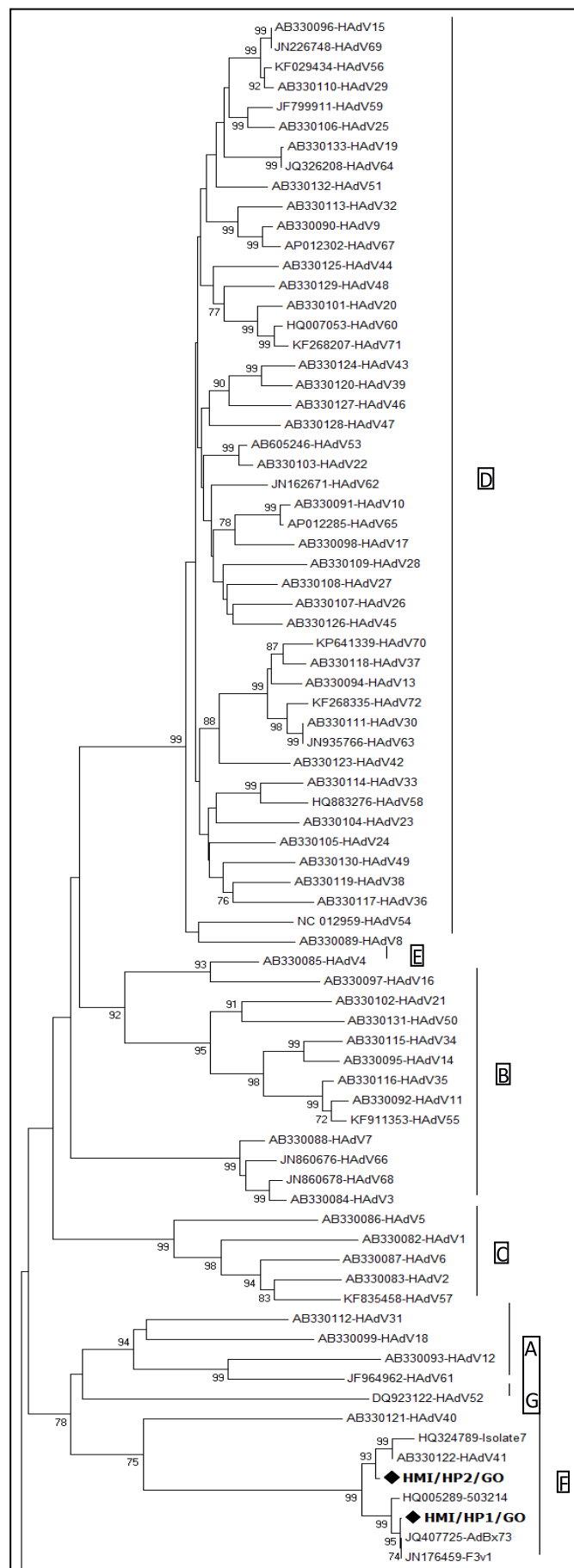


Figura 6. Árvore filogenética das sequências parciais do hexon das sete regiões hipervariáveis dos adenovírus detectados no estudo. Os nós internos são representados por valores de bootstrap obtidos em 1000 replicadas. Os diamantes representam as amostras haplótipos caracterizadas do estudo.

6 DISCUSSÃO

Os HAdVs infectam pessoas em todo mundo, sendo associados a sintomas oculares, respiratórios, gastroentéricos, dentre outros, com alta incidência principalmente entre crianças (Mandelboim et al. 2011, Miura-Ochiai et al. 2007). Os HAdVs são considerados como o terceiro mais frequente causador de GEA em todo mundo e ainda é um dos principais agentes causadores de doenças agudas respiratórias, atingindo indivíduos de todas as idades, porém os maiores índices de morbimortalidade ocorrem nas crianças menores de cinco anos e em indivíduos imunocomprometidos (Ampuero et al. 2012, Dey et al. 2011).

Considerando a relevância desse agente epidemiológico, o presente estudo teve como objetivo a pesquisa de HAdVs em amostras clínicas de crianças com até cinco anos de idade, com e sem sintomas de GEA e ou sintomas respiratórios, atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás durante o período de um ano. Neste estudo foi observado índice de positividade global para HAdVs de 21 %. Dados da literatura revelam índices de positividade para HAdVs nas fezes ou *swab* nasofaríngeo variam de 1 a 33%, conduzidos em diferentes regiões do mundo, tais como Tailândia, Estados Unidos, China e Brasil (Kuypers et al. 2006, Sriwana et al. 2013, Raboni et al. 2014, Li et al. 2015, Vetter et al. 2015).

No presente estudo, a positividade nas fezes em crianças foi de 16%. Os índices de positividade para HAdV em amostras de fezes, por métodos moleculares, variam de acordo com a população de estudo e região no mundo, trabalhos exibem índices de positividade variam de 0,5-48,4% em amostras de crianças diferentes países (Bonot et al. 2014, Fajr et al. 2014, Legoff et al. 2013, Mans et al. 2014, Moyo et al. 2014). No estudo de Duarte et al. (2012), realizado no Brasil no estado de Minas Gerais, foram avaliadas amostras fecais de 392 crianças, sendo detectado positividade 4,1%, índice menor do que o encontrado nesse estudo. Entretanto, deve-se ressaltar que no estudo de Duarte et al (2012) a metodologia utilizada para a pesquisa de HAdV foi a imunocromatografia, enquanto que neste estudo foi utilizada metodologia mais sensível.

Os HAdVs entéricos causam gastroenterites principalmente em crianças com frequências variáveis. A gastroenterite aguda é uma causa comum de hospitalizações entre crianças e adultos, sendo caracterizada principalmente por

diarreia, vômitos e dores abdominais (Al-Thani et al. 2013). Foi observado que 21% das crianças com sintomas de GEA eram positivas para HAdV nas fezes. No estudo de Ouédraogo et al. (2016), foi observado um índice de positividade em fezes de crianças com sintomas de gastroenterite aguda (31,2%) utilizando qPCR multiplex, entretanto deve-se levar em consideração o elevado índice de positividade devido ao índice de mal nutrição de crianças, bem como assitência sanitária e de saúde inadequadas presentes no país africano Burkina Faso onde o estudo foi realizado.

Na região Centro-Oeste, no Brasil, Andreasi et al. (2008) analisaram amostras de fezes em crianças com diarreia, e detectaram DNA de HAdVs em 3,6% do total de amostras analisadas por PCR convencional, este índice foi menor do que o do presente estudo, devendo ser observado que no presente estudo a metodologia utilizada para a pesquisa de HAdV foi o qPCR TaqMan. Em outro estudo no Brasil, realizado em Juiz de Fora Minas Gerais, foi observado índice de positividade de 12,4% para HAdVs em crianças sintomáticas, também por PCR convencional (Reis et al. 2016).

Os HAdVs desempenham um papel importante nas infecções do trato respiratório, representando 1-20% das doenças respiratórias em países asiáticos e americanos (Estados Unidos, China, Tailândia, Brasil) (Sriwanna et al 2013, Li et al 2015, Kuypers et al 2006). De acordo com a literatura, a positividade para HAdVs por TaqMan qPCR em amostras do trato respiratório varia de 1,8 a 19,1% em diferentes regiões do mundo (Arango et al. 2015, Esposito et al. 2016, Grijalva et al. 2014; Marcone et al. 2015, Tortora et al. 2015).

Foi detectado índice de positividade em amostras de *swab* nasofaringeano de 9,5% no presente trabalho. Em Camarões, na África, foi avaliado a incidência de HAdVs em crianças hospitalizadas com sintomas respiratórios utilizando metodologia de duplex qRT-PCR, foi observado um índice de positividade de 27,4%, (Kenmoe et al. 2016), sendo este consideravelmente superior ao observado no presente estudo. Na China, foi observado índice de positividade de 16% em crianças com sintomas respiratórios (Wang et al. 2016). Em um estudo realizado no nordeste brasileiro realizado com crianças sintomáticas, foi observado índice de positividade de 3,7% (Gurgel et al. 2016). Já na região sudeste do Brasil, em São Paulo, o índice de positividade de adenovírus foi de 27% em crianças menores de dois anos hospitalizadas, utilizando o método de PCR convencional, sendo este índice superior ao encontrado no presente estudo, entretanto a população de estudo era composta

somente de crianças até dois anos de idade com infecções agudas no trato respiratório (Durigon et al. 2015).

Das crianças sintomáticas que apresentaram um ou mais sintomas gastroentéricos e/ou respiratórios e não foram positivas para HAdVs possivelmente poderiam ser positivas para outros vírus ou até mesmo outros agentes infecciosos, como bactérias que geralmente causam síndromes respiratórias e gastroentéricas dentre outros (Puerari et al. 2015, Thongprachum et al. 2016).

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a realizar a pesquisa de HAdV nos dois tipos de amostras de crianças com ou sem sintomas, atendidas em hospital em Goiânia utilizando método de RT-qPCR. Bil-lula et al. (2010) realizaram a pesquisa de HAdV em amostras fecais de crianças submetidas a transplante de medula óssea, com idade média de 9,5 anos, e observaram positividade para HAdV de 44,8%, sendo está bem superior a encontrada nesse trabalho, provavelmente devido ao caráter oportunista dos HAdVs em pacientes imunocomprometidos e do potencial de persistência dos adenovírus em ambiente nosocomial (Ganime et al. 2014, Ganzenmueller et al. 2011).

Os principais sintomas apresentados nas crianças no nosso grupo de pesquisa foram semelhantes aos relatados por outros, sendo tosse, febre, diarreia e vômito mais frequentes, entretanto, deve-se ressaltar que sintomas não são específicos e restritos somente as infecções causadas por HAdV, podendo estar associada a outros vírus (Chen et al. 2014, Raboni et al. 2014).

Os adenovírus têm sido detectados em crianças assintomáticas em alguns trabalhos como de Horward et al (2015) que detectaram HAdVs em 11% utilizando RT-PCR, sendo também observado neste estudo que além de detectar a presença dos HAdVs constatou uma considerável positividade em crianças assintomáticas. Alguns estudos trazem dados de positividade em populações assintomáticas por HAdVs como Dey et al. (2011) com incidência de 0,7%, entretanto a metodologia utilizada no estudo foi ensaio imunoenzimático, diferente deste estudo no qual utilizamos como metodologia um ensaio mais sensível e específico o qRT-PCR. A pesquisa viral em amostras de crianças sem sintomas é importante a fim de fornecer informações sobre a eventual ocorrência de vírus em pacientes assintomáticos, que poderiam ser potenciais disseminadores desses agentes, principalmente em ambiente nosocomial (Kenmore et al. 2016, Najioullah et al. 2004).

Os HAdVs foram detectados em ambas as estações seca e chuvosa na população atendida em hospital de Goiânia. Chan et al. (2015) estudaram o padrão de sazonalidade de vários vírus respiratórios em Hong Kong por um período de 15 anos e observaram um decréscimo na incidência de HAdVs nos meses de agosto e setembro em hospitalizados, semelhante a este estudo que observou ausência de positividade no mês de agosto e setembro em *swab* nasofaríngeo. Moyo et al. (2014) em seu estudo na Tanzânia pesquisaram HAdVs em amostras fecais de crianças e não observaram diferenças na positividade para HAdVs na estação chuvosa e seca. No Brasil a sazonalidade é variável, tem sido detectado HAdVs em vários meses do ano (Raboni et al. 2014, Cardoso et al. 1992, Andreasi et al. 2008, Maranhão et al. 2009). Estudos como de Proença-Módena et al. (2014) relatam flutuações na positividade de HAdVs respiratório sem períodos sazonais, com baixas nas estações de seca e picos durante as estações secas e chuvosas. Em outro estudo realizado no Brasil por Raboni et al. (2014), foi descrita maior incidência estações de seca, entretanto não foi observado padrão sazonal em HAdVs detectados em amostras fecais.

As cargas virais nas amostras fecais foram $1,57 \times 10^{13}$ cópias/g e nas amostras de *swab* nasofaríngeo foram em média $8,79 \times 10^{11}$ cópias/mL. Alguns estudos têm demonstrado que a carga viral pode ter direta correlação com a gravidade dos sintomas (Walls et al. 2005), entretanto, outros estudos reportam elevadas cargas virais também em amostras fecais crianças imunocompetentes durante a primeira infecção (Aberle et al. 2003, Tsou et al. 2012), sendo, portanto, necessários mais estudos que tentem associar sintomas clínicos com a carga viral. Em pacientes imunocomprometidos com infecção por HAdVs a carga viral pode resultar na disseminação viral e doença sistêmica (Shike et al. 2005).

Pacientes com gastroenterite viral podem excretar cerca de 10×10^5 a mais de 10×10^{11} partículas virais por grama de fezes (Okoh et al. 2010). No trabalho de Berciaud et al. (2012), estudo como os poucos já descritos, com participantes do estudo crianças imunocompetentes e crianças imunodeprimidos, foram detectadas cargas virais elevadas (10^{10} cópias/mL), em fluidos respiratórios e fezes, de pacientes imunocompetentes, de modo semelhante ao que foi observado neste trabalho, entretanto, os limites superiores de cargas virais observadas neste estudo foram superiores aos relatados na maioria dos estudos realizados na população infantil, sendo ainda observadas elevadas cargas virais tanto em crianças com ou sem sintomas. Em um estudo conduzido em pacientes submetidos a transplante alogênico de células

progenitoras hematopoiéticas, realizado recentemente em Goiânia, foi observada positividade para HAdV em 57% dos pacientes e cargas virais de até 2×10^8 cópias/g nas fezes sendo a grande maioria dos pacientes indivíduos adultos (Santos et al. 2016). Como referido, em pacientes imunocomprometidos como os submetidos a transplante, as infecções por HAdVs podem resultar em elevada carga viral que pode refletir um pior prognóstico (Shike et al. 2005)

No estudo de Kohdera et al. (2006) cargas virais em amostras clínicas variaram de 10×10^5 à 10×10^{10} cópias/mL de *swab* de garganta, enquanto que no estudo de Lu et al (2013), foram detectadas cargas virais de 10^8 cópias/mL de HAdVs em mais de um tipo de amostras respiratórias (*swab* nasofaríngeo, *swab* de garganta e escarro), cargas virais altas, assim como as cargas virais encontradas neste estudo em amostras de *swab* nasofaríngeo.

Em geral, neste estudo, foram encontradas cargas virais altas tanto em amostras fecais como nas de *swab* nasofaríngeo, as amostras com menores cargas virais apresentaram 10^8 cópias genômicas por mL. Foi observado que cargas mais elevadas estavam presentes em amostras de pacientes sintomáticos, podendo-se sugerir uma associação entre altas cargas virais e sintomas, entretanto, outros fatores também devem ser considerados, tais como estado imunológico do paciente, idade, dentre outros.

Foram observadas, com maior frequência, cargas virais mais altas em amostras de crianças sintomáticas tanto em fezes quanto em *swab* nasofaríngeo, em relação às assintomáticas. Como já referido, a carga viral tem direta correlação com a gravidade dos sintomas, entretanto altas cargas virais são observadas em crianças durante a primeira infecção (Aberle et al. 2003, Tsou et al. 2012), sendo, portanto, necessários mais estudos que associem sintomas clínicos com cargas virais.

Os adenovírus podem ser excretados tanto nas fezes quanto em secreções nasais e tem sido demonstrado que os tipos de HAdVs que infectam o trato respiratório podendo ser encontrados nas fezes, provavelmente devido a deglutição das secreções do trato respiratório superior, mesmo não ocorrendo replicação ou doença no trato gastrointestinal (Vetter et al. 2015). Avaliando as amostras submetidas ao sequenciamento a fim de determinar as espécies e tipos de HAdVs, das treze amostras sequenciadas, uma amostra positiva para HAdV caracterizada como pertencente a espécie B tipo 3 e cinco amostras pertenciam a espécie F tipo 41, todas provenientes de amostras fecais. A espécie B é comumente encontrada em amostras de em pacientes

com síndromes respiratórias como a doença respiratória aguda, podendo ser resultado da deglutição de partículas virais presentes nas vias superiores, como já descrito (Berk et al. 2013).

Amostras do tipo 41 circulam frequentemente no Brasil e no mundo, sendo conhecidamente associadas a GEA (Rey et al. 2011), cujos sintomas característicos foram observados nas crianças participantes desse estudo positivas para HAdVs com sintomas de GEA. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, HAdV-F tipo 40 e 41 foram descritos em casos esporádicos e surtos da doença em pacientes internados e ambulatoriais, causando síndromes gastroentéricas e até mesmo a morte, principalmente de crianças menores de 5 anos idade (Reis et al. 2016). Dey et al. (2011) observaram maior incidência de HAdVs tipo 41 em crianças com menos de dois anos de idade nos meses chuvosos, especificamente nos meses de fevereiro e março. No estudo de Filho et al. 2007 realizado no Brasil, foi observado maior incidência de HAdVs tipo 41 em crianças hospitalizadas e as sequências apresentaram 100% de identidade nucleotídica, com maior incidência nos meses de fevereiro a abril. No estudo na região Centro-Oeste realizado por Freitas et al. 2010, foi observado maior frequência de HAdVs caracterizados como espécie F em 76,9% das amostras. A predominância da espécie F em amostras de fezes de crianças da região foi corroborada pelo presente estudo.

As sequências obtidas através do sequenciamento genômico foram alinhadas pelo software ClustalX 2.1, foi observada uma inserção de três nucleotídeos na posição 1355 bp- 1357 (451 aa), na região v3 do loop dois do hexon na sequência haplótipo um, inserção presente em algumas sequências posteriormente depositadas no GenBank. As regiões de variabilidade estão localizadas nos loops um e dois da proteína do hexon, a região v3 está localizada no loop dois da proteína do hexon. O loop um (aa 131-331) e o loop dois (aa 423-477) da proteína hexon são voltados para a superfície do vírus e contêm epítomos específicos imunogênicos (Toogood et al. 1992). Baley & Mautner (1994) compararam sequências do hexon de vários tipos de HAdV, e observaram que as regiões pedestais do hexon são altamente conservadas e os loops são regiões com considerável variabilidade. O estudo Pichla-Gollon et al. (2007) relatou que as mutações nos loops permitem que o vírus escape do reconhecimento do sistema imunológico como, por exemplo, a neutralização por anticorpos específicos (Crawford-Miksza et al. 1996, Ebner et al. 2005, Onion et al. 2007, Rux et al. 2003, Wu et al. 2005).

Embora o presente estudo tenha avaliado 200 crianças com ou sem sintomas em dois tipos de amostras diferentes provenientes de um mesmo paciente, mais estudos devem ser realizados no intuito de se obter mais dados sobre a ocorrência, carga viral e tipo de HAdV em relação à sintomatologia e dados demográficos das crianças. Esperamos que os resultados obtidos possam contribuir para um maior esclarecimento a respeito das infecções causadas pelos HAdVs em crianças.

7 CONCLUSÃO

- Foi observado considerável índice de positividade para HAdV (21%), nas fezes (16%) e em *swab* nasofaríngeo (9,5%) obtidas de crianças com até cinco anos de idade com ou sem sintomas de GEA e respiratório de crianças atendidas no Hospital materno infantil, sendo ainda observado que algumas crianças foram positivas em ambas as amostras clínicas. No grupo assintomático foi também detectada positividade significativa (19,7%). Uma maior frequência de positividade foi observada em crianças com até 48 meses de idade;
- Em geral, as crianças que apresentaram algum tipo de sintoma (gastroentérico e/ou respiratório) apresentaram cargas virais mais elevadas, quando comparadas às assintomáticas;
- Foi observada relação entre sintomas e positividade em crianças com sintomas de GEA;
- Foram identificados, dentre as amostras positivas, HAdVs espécies F tipo 41, e ainda uma amostra espécie B tipo 3. Todas provenientes de amostras fecais. Sendo ainda observada que três amostras sequenciadas apresentaram uma inserção de três nucleotídeos em região variável do hexon;
- Como perspectivas, esperamos que, ao final do estudo, possamos obter resultados que forneçam informações sobre a frequência, epidemiologia molecular e carga dos adenovírus em dois tipos de amostras clínicas da população de estudo, em associação com sintomatologia apresentada pelas crianças participantes do estudo;

REFERÊNCIAS

- Abd-Jamil J, Teoh T, Hassan E, Roslan N, AbuBakar S. Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at university of Malasia Medical Center. *BMC Pediatric* 10: 1-7, 2010.
- Aberle SW, Aberle JH, Steininger, Matthes-Martin S, Pracher E, Popw-Kraupp T. Adenovirus DNA in serum of children hospitalized due to an acute respiratory infection. *J Infect Dis* 187(2): 311-314, 2003.
- Ahi YS, Vemula SV, Hassan AO, Costakes G, Stauffacher C, Mittal SK. Adenovirus L4 33K forms ring-like oligomers and stimulates ATPase activity of IVa2 : Implications in viral genome packaging. *Front Microbiol* 6: 1-11, 2015.
- Akan H, Izbirak G, Gurol Y, Sarikaya S, Gunduz TS, Yilmaz G, Hayran O, Vitrinel A. Rotavirus and adenovirus frequency among patients with acute gastroenteritis and their relationship to clinical parameters; a retrospective in Turkey. *Asia Pac Fam Med* 8(1): 1-8, 2009.
- Al-Thani A, Baris M, Al-Lawatti L, Dhahry S. Characterising the aetiology of severe acute gastroenteritis among patients a hospital in Qatar using real-time polymerase chain reaction. *BMC Infect Dis* 229: 1-5, 2013.
- Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK, Gabbay YB, Matos NB. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, Western Brazilian, Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(2): 215-221, 2015.
- Ampuero JS, Ocaña V, Gómez J, Gamero ME, Garcia J, Halsey E S, Laguna-Torres VA. Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *Plos One* 10:1-14, 2012.
- Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, Fiaccadori FS, Santos RA, Souza M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal sample of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campos Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(7): 741-744, 2008.
- Arango AE, Jaramillo S, Perez J, Ampuero JS, Espinal D, Donado J, Felices V, Garcia J, Laguna-Torres A. Influenza-like illness sentinel surveillance in one hospital Medellin, Colombia, 2007-2012. *Influenza Other Respir Viruses* 9(1): 1-13, 2015.
- Armstrong D. Review article: Gastric pH- the most relevant predictor of benefit in reflux disease?. *Aliment Pharmacol Ther* (s5):19-26, 2004.
- Aslan A, Xagorarakis I, Simmons FJ, Rose JB, Dorevitch S. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J Appl Microbiol* 111(5): 1250-1261, 2011.

- Baley A, Mautner V. Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* 205(2): 438-452, 1994.
- Berciaud S, Rayne F, Kassab S, Jubert C, Corte MD, Salin F, Wodrich H, Lafon ME. Adenovirus infections in Bordeaux University Hospital 2008-2010: clinical and virological features. *J Clin Virol* 54: 302-307, 2012.
- Berk. Adenoviruses. *In*: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Bil-Lula I, Ussowicz M, Ribka B, Wendycz-Domalewska D, Ryczan R, Gorczynska E, Kalwak K, Wozniak M. PCR diagnostic and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Arch Virol* 155(12): 2007-2015, 2010.
- Bil-Lula I, Franceschi N, Pawlik K, Wozniak M. Improved real-time PCR assay for detection and quantification of all 54 known types of human adenovirus in clinical samples. *Med Sci Monit* 18: 1-8, 2012.
- Bonot S, Ogorzaly L, El Moulaj JB, Zorzi W, Cauchie HM. Detection of small amounts of human adenoviruses in stools comparison of new immune real-time PCR assay with classical tools. *Clin Microbiol Infect* 20(12): 1-7, 2014.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shiyak, Block R. WHO estimates of the cases of death in children. *Lancet* 365: 1147-1152, 2005.
- Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Mdel C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine Children. *BMC Pediatric* 2: 1-7, 2002.
- Cardoso DDP, Martins RMB, Kitajima EW, Barbosa AJ, Camarota SCT, Azevedo MSP. Rotavirus and adenovirus in children 0-5 years of age with or without gastroenteritis in hospitals from Goiânia-GO, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 34, 1992.
- Carvalho MC, da Silva DC. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Cienc Rural* 40(3): 735-744, 2010.
- Cassir N, Hraiech S, Nougairède A, Zandotti C, Fournier PE, Papazian L. Outbreak of adenovirus type 1 severe pneumonia in French intensive care unit, september-october 2012. *Euro Surveill* 19(39): 1-7, 2014.
- Cebey-López M, Herberg J, Pardo-Seco J, Gómez-Carballal A, Martínón-Torres N, Salas A, Martínón-Sánchez JM, Gormley S, Sumner E, Fink C, Martínón-Torres. Viral Co-infections in pediatric hospitalized with lower tract acute respiratory infections. *Plos One* 10(9): e0136526, 2015.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adenovirus. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/adenovirus/index.html>>. Acesso em: 5 de mar, 2015.

Chan PK, Tam WW, Lee TC, Chan MC, Mok KY, Wong MC, Leung AC, Ho WC, Nelson EA, Hui DS. Hospitalization incidence, mortality, and seasonality of common respiratory viruses over a period of years in a developed subtropical city. *Medicine (Baltimore)* 94(46): e2024, 2015.

Chen ZC, Ji W, Wang Y, Yan Y, Shao X, Zhang X, Xu J. Etiology of acute bronchiolitis and relationship with meteorological conditions in hospitalized infants in China. *J Formos Med Assoc* 113(7):463-469, 2014.

Condezo GN, Marabini R, Ayora S, Carazo JM, Alba R, Chilón M, San Martín C. Structures of adenovirus incomplete particles clarify capsid architecture and show maturation changes of packaging protein L1 52/55K. *J Virol* 89(18): 9653-9664, 2015.

Crawford-Miksza L, Schnurr DP. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J Virol* 70(3): 1836-1844, 1996.

Cui X, Wen L, Wu Z, Liu N, Yang C, Liu W, Ba Z, Wang J, Yi S, Li P, Jia L, Hao R, Wang L, Hua Y, Wang Y, Qiu S, Song H. Human adenovirus type 7 infection associated with severe and fatal acute lower respiratory illness and nosocomial transmission. *J Clin Microbiol* 53(2): 746-749, 2015.

Dashti AS, Ghahreman P, Hashemipoor T, Karimi A. Molecular Epidemiology of enteric adenovirus gastroenteritis in under-five-year-old children in Iran. *Gastric Res Pract* 2016: 1-5, 2016.

Dey R, Gosh S, Chawla-Sarkar M, Panchalingam S, Nataro JP, Sur D, Manna B, Ramamurthy T. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* 49(2): 500-505, 2011.

Díaz J, Morales-Romero J, Pérez-Gil G, Bedolla-Barajas M, Delgado-Figueroa N, García-Román R, López-López O, Bãnuelos E, Rizada-Antel C, Zenteno-Cuevas R, Ramos-Ligonio A, Sampieri CL, Orozco-Alatorre LG, Mora SI, Montero H. Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study. *Ital J Pediatric* 41: 33, 2015.

Duarte RJ, Mendes EN, Penna FJ, Filho LA, Magalhães PP. Low prevalence of adenoviruses in children with acute diarrhea in Belo Horizonte- MG. *J Bras Patol Med Lab* 48(4): 1-5, 2012.

Durigon GS, Oliveira DB, Felício MC, Finelli C, Pereira MF, Storni JG, Caldeira RN, Berezin RC, Durigon EL, Berezin EN. Poor outcome of acute respiratory infection in young children with underlying health condition in Brazil. *Int J Infect* 4: 3-7, 2015.

Dusátková L, Zamrazilová H, Aldhoon Hainerová I, Atkinson RL, Sedláčková B, Lee ZP, Vcelak J, Bendlová B, Kunesová M, Hainer V. Association of adenovirus 36 infection with obesity-related gene variants in adolescents. *Physiol Res* 64 (2) S5197-S202, 2015

Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol* 79(20): 12635-12642, 2005.

Echavarria M. Adenovirus in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 21(4): 704-715, 2008.

Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Jr TF, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne A M-M. "Adenovirus": Group name proposed for new respiratory tract viruses. *Science* 124:1-2, 1956.

Esposito S, Zampiero A, Bianchini S, Mori A, Scala A, Tagliabue C, Sciarrabba CS, Fonsali E, Piralla A, Principi N. *c. Plos One* 11:1-13, 2016.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3):175-185, 1998.

Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Moriscot C, Ruigrok RW, Boulanger P, Schoehn G. The C-terminal domains of adenovirus serotype 5 protein IX assemble into an antiparallel structure on the facets of the capsid. *J Virol* 83(2): 1135-1139, 2009.

Fajr M, Stepanova V, Pliskova L, Fajfrova J. Viral gastroenteritis in Eastern Bohemia region of the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 63(s.88-91), 2014.

Fay N, Panté N. Nuclear entry of DNA viruses. *Font Microbiol* 6: 476, 2015. Finianos M, Issa R, Curran MD, Afif C, Rajab M, Irani J, Hakimeh N, Naous S, Hajj MJ, Hajj P, El Jisr T, El Chaar M. Etiology, seasonality and clinical characterization of viral respiratory infections among hospitalized children in Beirut, Lebanon. *J Med Virol* 88(11): 1874-1881, 2015.

Filho EP, Faria NR, Fialho AM, Assis RS, Almeida MM, Rocha M, Galvão M, Santos FB, Barreto ML, Leite JP. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol* 56(Pt3): 313-319, 2007.

Finianos M, Issa R, Curran MD, Afif C, Rajab M, Irani J, Hakimeh N, Naous A, Haji MJ, Haji P, El Jisr T, El Chaar M. Etiology, seasonality and clinical characterization of viral respiratory infections among hospitalized children in Beirut, Lebanon. *J Med Virol* 88(11): 1874-1881, 2016.

Freitas ER, Borges AM, Fiaccadori FS, Cradoso Dd. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. *Arch Virol* 155(10): 1693-1693, 2010.

Fonseca G, Cohen M, Mymryk J. Adenovirus E1A recruits human Paf1 complex to enhance transcriptional elongation. *J Virol* 88(10): 5630-5637, 2014.

Freitas F. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *Brazil J Infect* 17: 62-68, 2013.

Fuchsova B, Serebryamy L, Lanerolle P. Nuclear actin and myosins in adenovirus. *Exp Cell Res* 338(2):170-182, 2015.

Ganime AC, Carvalho-Costa FA, Santos M, Costa Filho R, Leite JP, Miagostovich MP. Viability of human adenovirus from hospital fomites. *J Med Virol* 86(12): 2065-2069, 2014.

Ganzenmueller T, Buchholz S, Harste G, Dammann E, Trenscher R, Heim A. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J Clin Virol* 52(1): 55-59, 2011.

Ganzenmueller T, Heim A. Adenoviral load diagnostics by quantitative polymerase chain reaction: Techniques and application. *Rev Med Virol* 22(3): 194-208, 2012.

Ghebrenedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol* 4 (1): 26-33, 2014.

Ginsberg, H. S. Discovery and classification of adenoviruses. In: SETH, P. (ed.), **Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy**. 1 ed. Texas: R.G. Landes Company: 1-3, 1999.

Gordon D, Desmarais C, Green P. Automated finishing with autofinish. *Genome Res* 11(4): 614-625, 2001.

Gray G. Adenovirus transmission-worthy of our attention. *J Infect Dis* 194(7):871-873, 2006.

Greber UF. Virus and host mechanics support membrane penetration and cell entry. *J Virol* 90(8): 3802-3805, 2016.

Grijalva CG, Griffin MR, Edwards KM, Williams JV, Gil AL, Verastegui H, Hartinger SM, Vidal je, Klugman KP, Lanata CF. The role of influenza and parainfluenza infections in nasopharyngeal pneumococcal acquisition among young children. *Clin Infect Dis* 58(10): 1369-1376, 2014.

Gurgel RQ, Bezerra PG, Duarte Mdo C, Moura AÁ, Souza EL, Silva LS, Suzuki CE, Peixoto RB. Relative frequency, possible risk factors, viral codetection rates and seasonality syncytial virus among children with lower respiratory tract infection in Northeastern Brazil. *Medicine (Baltimore)* 95(15): e3090, 2016.

Hage E, Liebert UG, Ganzenmueller T, Heim A. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant speciesD mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipients. *J Gen Virol* 96: 2734-2742, 2015.

Hall K, Blair Zajdel ME, Blair GE. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J* 431(3):321-336, 2010.

Hamkar R, Yahyapour Y, Noroozi M, Nourjelyani K, Jalilvand S, Adibi L, Vaziri S, Poor-Babaeia A, Pakfetrat A, Savad-Koochi R. Prevalence of rotavirus, adenovirus, and

astrovirus infections among patients with acute gastroenteritis in, Northern Iran. *Iran J Public Health* 39(2): 45-51, 2010.

Heemsherk B, Lankester AC, Vreeswyk TV, Beersman M F, Claas E C, Veltrop-Duits LA, Kroes A C, Vossen JM, Scilham MW, Van Tol MJ. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis* 191(4): 520-530, 2005.

Heemsherk B, Vreeswijk T V, Veltrop-Duits LA, Sombroek CC, Franken K, Verhoosel RM, Hiemstra PS, Leeuwen DV, Reesing ME, Toes RE, Tol MJ, Schilham MW. Adenovirus-specific CD4+ T cell clones recognizing in vitro through cognate interaction. *J Immunol* 177(12): 8851-8859, 2006.

Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF. Innate immunity to adenovirus. *Hum Gene Ther* 25(4): 265-284, 2014.

Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girores R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4523-4533, 2002.

Hiroi S, Morikawa S, Takahashi K, Komano J, Kase T. Molecular epidemiology of human adenoviruses D associated with epidemic keratoconjunctivitis in Osaka, Japan, 2001-2010. *Jpn J Infect* 66: 436-438, 2013.

Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel ST, Boulanger PA. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I $\alpha 2$ domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cell. *Embo J* 16(9): 2294-2306, 1997.

Horward LM, Johnson M, Williams JV, Zhu Y, Gil AL, Edwards KM, Griffin MR, Lanata CF, Grijalva CG, RESPIRA-PERU Group. Respiratory viral detections during symptomatic and asymptomatic periods in young Andean children. *Pediatric Infect Dis J* 34(10):1074-1080, 2015.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2013 release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 05 de jun, 2015.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2015 release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 31 jul 2015.

Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet A, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankuo-Ripa M, Kenne A, Beng VP, Vabret A, Njouom R. Viral etiology of severe acute respiratory infections in hospitalized children in Cameroon, 2011-2013. *Influenza Other Resp Viruses* Doi:10.1111/Irv.12391: 1-8, 2016.

Khoshdel A, Parven N, Doosti A, Famouri F. Prevalence of nosocomial diarrhea due to adenovirus 40 and 41 in pediatric ward in Iran. *J Clin Diagn Resp* 9(12): 1-3, 2015.

- Kim D. Replication selective oncolytic adenovirus: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* 19 (56): 6660-6669, 2000.
- Kim J, Kim HS, Kim H, Kim J, Song W, Lee KM, Lee S, Park K, Lee W, Hong YJ. Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of Rotavirus and Adenovirus in stool samples. *Ann Lab Med* 34(3): 216-222, 2014.
- Ko G, Cromeans T, Sobsey M. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 69(12): 7377-7384, 2003.
- Kotha PL, Sharma P, Kolawole AD, Yan R, Alghamri MS, Brockman TL, Gomez-Cambronero J, Excoffron KJ. Adenovirus entry from the apical surface of polarized epithelia is facilitated by the host innate immune response. *Plos Pathog* 11(3):1-22, 2015.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* (submitted).
- Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M, Cent A, Corey L, Marrow R. Comparison of Real-Time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 44 (7): 2382-2388, 2006.
- Lam Y, Evans V, Heesom K, Lamond, Matthews D. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus infected cells. *Mol Cell Proteomics* 9(1):117-130, 2010.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgs DG. Clustal Wand Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948, 2007.
- Leen AM, Bollard CM, Myers GD, Rooney CM. Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow transplant* 12 (3): 243-251, 2006.
- LeGoff J, Feghoul L, Mercier-Delarue S, Dalle H, Sceux C, Chérot J, Fontbrune F, Baruchel A, Socié G, Simon F. Broad-Range PCR electrospray ionization mass spectrometry for detection and typing of adenovirus and other opportunistic viruses in stem cell transplant patients. *J Clin Microbiol* 51(12): 4186-4192, 2013.
- Lekana-Douki SE, Kombila-Kumavor C, Nkoghe D, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus, and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. *Int J Infect Dis* 34: 90-95, 2015.
- Lenman A, Liaci A M, Liu Y, Ardahl C, Rajan A, Nilsson E, Bradford W, Kaeshammer L, Jones M S , Frangsmyr L, Feizi T, Stehle T, Arnberg N. Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *Plos Pathog* 11(2):1-23, 2015.
- Li Y, Zhou W, Wang Y, Xie Z, Lou Y, Tan W. Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among paediatric patients with severe acute respiratory infection in China. *Plos One* 10(4):1-10, 2015.

Lichtenstein DL & Wold WSM. Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication-competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission. *Cancer Gene Ther* 11: 819-829, 2004.

Lin C, Lu L, Lin H, Chu Y, Wang F, Lin H, Liu F. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human adenovirus caused and outbreak in Taiwan during 2011. *Plos One* 10:1-13, 2015.

Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, Mattes-Martin S, Suda M, Futterknecht B, Lawitschke A, Peterc C, Potschger V, Gadner H. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102: 194-208, 2012.

Lion T. Adenovirus in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol* 27: 441-462, 2014.

Lopes-João A, Costa I, Mesquita JR, Oleastro M, Penha-Gonçalves C, Nascimento MS. Multiple enteropathogenic viruses in a gastroenteritis outbreak in a military exercise of the portuguese army. *J Clin Virol* 68: 73-75, 2015.

Lu MP, Dong L, Chen Z. Clinical characteristics of adenovirus associated lower respiratory tract infection in children. *World J Pediatric* 9(4): 346-349, 2013.

Lu X, Truffillo-Lopez E, Lott L, Erdman D. Quantitative real-time PCR assay panel for detection and type-specific identification of epidemic respiratory human adenovirus. *J Clin Microbiol* 51 (4): 1089-1093, 2013.

Mandelboim M, Dror P, Azar R, Broemberg M, Mendelson E. Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: Epidemiology and molecular characterization. *J Clin Microbiol* 49(2): 597-601, 2011.

Mangel WF, San Martín C. Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses* 6(11): 4536-4570, 2014.

Mans J, Van Zyl WB, Taylor MB, Page NA, Sobsey MO, Bernard TG, Potgieter N. Applicability of Bio-Wipes for the collection of human faecal specimens for detection and characterisation of enteric viruses. *Trop Med Int Health* 19:293-300, 2014.

Maranhão AG, Soares CC, Albuquerque MC, Santos N. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. *Ver Inst Med Trop S Paulo* 51: 227-229, 2009.

Marccone DN, Durand LO, Azziz-Baumgartner E, Vidaurreta S, Ekstrom J, Carballal G, Echavarría M. Incidence of viral respiratory infections in a prospective cohort of outpatient and hospitalized children aged ≤ 5 years and its associated cost in Buenos Aires, Argentina. *BMC Infect Dis* 15: 447-456, 2015.

Meulenbroek RA, Sargent KL, Lunde J, Jasmin BJ, Parks RJ. Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptide on the virion-generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. *Mol Ther* 9: 617-624, 2004.

Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, Suzuki E, Ishiko H. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 45(3): 958-967, 2007.

Moyo S, Hanevik K, Bloemberg B, Kommedal O, Maselle S, Langeland N. Prevalence and molecular characterization of human adenovirus in diarrheic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis* 14:1-9, 2014.

Najioullah F, Tissot Guerraz F, Thouvenot D, Milon MP, Lachaux A, Floret D.[Nosocomial infections due to adenovirus in a paediatric unit]. *Pathol Biol* 52(1): 16-20, 2004.

Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Trinh QD, Yan H, Hoang P, Okitsu S, Usljima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea In Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol* 79(5): 582-590, 2007.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as source of human enteric viruses in environment. *Int J Environ Res Public Health* 7: 2620-2637, 2010.

Onion D, Crompton LJ, Milligan DW, Moss PA, Lee SP, Mautner V. The CD 4+ T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. *J Gen Virol* 88(Pt 9): 2417-2425, 2007.

Ortega-Esteban A, Condezo G N, Pérez-Berná A J, Chilón M, Flint SJ, Reguea D, San Martín C, Pablo PJ. Mechanics of viral chromatin reveals the pressurization of human adenovirus. *ACS Nano* 9(11): 10826-10833, 2015.

Osborne CM, Montano AC, Robinson CC, Stracey S, Dominguez SR. Viral gastroenteritis in children in Colorado 2006-2009. *J Med Virol* 87(6): 931-939, 2015.

Ouédraogo N, Kaplon J, Bonkougou J, Travré AS, Pothier P, Barro N, Ambert-Balay K. *Plos One* 11(4): e0153652, 2016.

Ozsari T, Bora G, Kaya B, Yakut K. Prevalence of rotavirus and adenovirus in the childhood gastroenteritis. *Jundishapur J Microbiol* 9(6): e34867, 2016.

Pauly M, Hoopé E, Mugisha L, Petrzalkova K, Akouva-Koffi C, Couacy-Hymann E, Anoh A, Mossoun A, Schubert G, Wiersma L, Pascale S, Muyenbe J, Anoh A, Karhemere S, Weiss S, Calvignac-Spencer S, Leendertz F, Ehless B. High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. *Virol J* 11: 1-22, 2014.

Pichla-Gollon SL, Drinker M, Zhou X, Xue F, Rux JJ, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC, Burnett RM, Bergelson JM. Structure-based identification of major neutralizing site in a adenovirus hexon. *J Virol* 81(4): 1680-1689, 2007.

- Pilger DA, Cantarelli VV, Amarantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(1): 56-60, 2011.
- Pimenta AI, Guerreiro D, Madureira J, Margaça FM, Cabo Verde S. Tracking human adenovirus inactivation by gamma radiation under different environmental conditions. *Appl Environ Microbiol* 82(17): 5166-5173, 2016.
- Pozzuto T, Roger C, Kurreck J, Fechner H. Enhanced suppression of adenovirus replication by triple combination of anti-adenoviruses SiRNAs, soluble adenovirus receptor trap sCAR- Fc and cidofovir. *Antiviral Res* 120: 72-78, 2015.
- Puerari D, Camargo C, Gratura S, Watanabe AS, Granate C, Cristina N, Bellei J. Application of molecular assay for adenovirus detection among different pediatric patients. *Rev Paul Pediatric* 33(2):1-6, 2015.
- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenovirus and Enteroviruses in polluted waters by Nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 60(8): 2963-2970, 1994.
- Raboni SM, Damasio GA, Ferreira C, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Cruz CR, Almeida SM. Acute gastroenteritis and enteric viroses in hospitalised children in Southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(4): 428-435, 2014.
- Reddy VS, Nemerow GR. Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 32: 11715-11720, 2014.
- Reis TA, Assis AS, Valle DA, Barletta VH, Carvalho JP, Rose TL, Portes SA, Leite JP, Silva ML. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrhea disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. *Braz J Microbiol* 47: 243-250, 2016.
- Ren L, Gonzalez R, Wang Z, Xiang Z, Wang Y, Zhou H, Li J, Xiao Y, Yang Q, Zhang J, Chen L, Wang W, Li Y, Li T, Meng X, Zhang Y, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Chen J, Jin Q, Wang J. Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005–2007. *Clin Microbiol Infect* 15(12): 1146-1153, 2009.
- Rojas LJ, Jaramillo CA, Mojica MF, Escalante MP, Delgado P. Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian pediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiol Infect* 140:818–822, 2011.
- Robinson CM, Seto D, Jones MS, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evo* 11(6): 1208-1217, 2011.
- Rodrigues MT, Henzel A, Staggemeir R, Quevedo DM, Rigotto C, Heinzelmann L, Nascimento CA, Spilki FR. Human adenovirus spread, rainfalls, and the occurrence of gastroenteritis cases in Brazilian basin. *Environ Monit Assess* 187(11): 1-12, 2015.

Rutella S, Locatelli F. Strategies to harness immunity against infectious pathogen after haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transl Res* 3(5): 404-421, 2011.

Ruuskanen O, Mertsola J, Meurman O. Adenovirus infection in families. *Arch Dis Child* 63(10): 1250-1253, 1988.

Rux JJ, Kuser PR, Burnett RM. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *J Virol* 77(17): 9553-9566, 2003.

Sadeghi C, Aebi C, Gorgieuski-Hrisoho M, Muhlemann K, Barbani M. Twelve years detection of respiratory viruses by immunofluorescence in hospitalized children: impact of the introduction of a new respiratory picornavirus assay. *BMC Infect Dis* 11:41-47, 2011.

Saha B, Wong CM, Parks R J. The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses* 6(9): 3563-3583, 2014.

San Martín C. Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses* 4(5):847-877, 2012.

Santos HCP, Almeida TN, Fiaccadori FS, Cardoso DDP, Arantes AM, da Silva HD, Nagib PR, Souza M. Adenovirus infection among allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*. DOI:10.1002/jmv.24579, may 19, 2016.

Sarantis H, Grant J, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenovirus by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 42(9): 3963-3969, 2004.

Shike H, Shimizu C, Kanegaye J, Foley JL, Burns JC. Quantitation of adenovirus genome during acute infection in normal children. *Pediatric Infect Dis J* 24(1):29-33, 2005.

Sriwana P, Chieochansin T, Vuthitanachot C, Vuthitanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009-2012. *Virol J* 10: 1-10, 2013.

Tang L, Wang L, Tan X, Xu W. Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi province, China. *Virol J* 8:3-30, 2011.

Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AF, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushyima H. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol* 87(7): 551-570, 2016.

Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 69(1): 577-582, 2003.

Tiemessen CT, Kidd AH. Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity by differences in patterns of DNA replication. *J Virol* 68(2): 1239-1244, 1994.

Toogood CIA, Crompton J, Hay RT. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* 73(Pt6): 1429-1435, 1992.

Top FH Jr. Control of adenovirus acute respiratory disease in U.S. army trainees. *Yale J Biol.* 48(3): 185-95, 1975.

Tórtora RP, Guimarães MA, de Souza CM, Santos IA, Varella RB, de Fátima Pombo March M, da Cunha AJ, Sant'Anna CC. Adenovirus species C detection in children under four years of age with acute bronchiolitis our recurrent wheezing. *J Clin Virol* 73: 77-80, 2015

Torres JP, De La Maza, Kors L, Villarroel M, Piemonte P, Izquierdo G, Salgado C, Tordecilla J, Contardo V, Farfán MJ, Mejías A, Ramilo O, Santolava ME. Respiratory viral infections and coinfections in children with câncer, fever and neutropenia: clinical outcome of infections caused by different respiratory viruses. *Pediatric Infect Dis J* 35(9): 949-954, 2016.

Toth K, Lee S R, Ying B, Spencer J F, Tollefson AE, Sgartz J E, Kong Il-K, Wang Z, Wold WSM. STAT2 knockout Syrian hamsters support enhancer replication and pathogenicity of human adenovirus revealing an important role of type I interferon response in viral control. *Plos Pathog* 11(8): 1-22, 2015.

Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C, Levoque N, Andreoletti L. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in Northern France. *J Clin Microbiol* 48(5): 1943-1946, 2010.

Tsou P, Tan F, Chang Y, Chen C, Huang P, Lai Y, Chao N, Wei H, Hung N, Hsu C, Lu Y, Chang Y, Liu T. Community outbreak of adenovirus, Taiwan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 1825-1832, 2012.

Varghese R, Mikyas Y, Stewart PL, Ralston R. Postentry neutralization of adenovirus type 5 by an antihexon antibody. *J Virol* 78(22): 12320-12332, 2004.

Vetter M, Staggemeir R, Vecchia A, Henzel A, Rigotto C, Spik F. Seasonal variation on the presence of adenoviruses in stools from non-diarrheic patients. *Braz J Microbiol* 46(1): 749-752, 2015.

Viral Zone. Representação da partícula viral de HAdVs, 2015. Disponível: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/183.html. Acesso em: 17/08/2016, às 14:31.

Walls T, Hawrami K, Ushiro –Lumb I, Shingadia D, Saha V, Shankar AG. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary. *Clin Infect Dis* 40(9): 1244-1249, 2005.

Wang H, Zheng Y, Deng J, Wang W, Liu P, Yang F, Jiang H. Prevalence of respiratory viruses among children hospitalized from respiratory infections in Shenzhen , China. *Virol J* 13: 1-5, 2016.

Watanabe A, Carraro E, Camargo C, Puerari D, Guaturas S, Granato C, Belle N. Human adenovirus detection among immunocompetent and immunocompromised patients presenting acute respiratory infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 46(2): 161-165, 2013.

Weaver EA. Vaccines within vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 10(3):544-556, 2013.

Wold W, Toth K. New drug on the horizon for treating adenovirus. *Expert Opin Pharmacother* 16: 2095-2096, 2015.

Wold WSM, Ison MG. Adenoviruses. *In*: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Wu H, Han T, Belousova V, Kashentseva E, Dmitriev I, Kataram M, Mahasreshti PJ, Curiel DT. Identification of sites in adenovirus hexon for foreign peptide incorporation. *J Virol* 79(6): 3382-3390, 2005.

Xagorarakis I, Kuo DH, Wong K, Wong M, Rose JB. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Appl Environ Microbiol* 73(24): 7874-7881, 2007.

Xu MY, Cao B, Wang DF, Guo JH, Chen KL, Shi M, Yin J, Lu QB. Human adenovirus 36 infection increased the risk of obesity: A meta-analysis update. *Medicine (Baltimore)* 94(51): e22357, 2015.

Yeung R, Eshaghi A, Lombor E, Blaur J, Mazulli T, Burton C, Drews S. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virol J* 6: 1-3, 2009.

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE VÍRUS NO TRATO RESPIRATÓRIO EM POPULAÇÃO PEDIÁTRICA

Pesquisador: Fabíola Souza Fiaccadori

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 37305314.7.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.210.852

Apresentação do Projeto:

Este projeto constitui um estudo observacional transversal para avaliar a detecção dos vírus do trato respiratório propostos em crianças com infecção respiratória aguda comparando sua detecção em crianças assintomáticas, o qual ainda fornecerá subsídios na avaliação do papel dos Bocavírus Humanos, estudo desenvolvido em projeto paralelo.

A população será constituída por crianças com até cinco anos de idade do sexo feminino e masculino em atendimento no Hospital Materno Infantil de Goiânia, Goiás; em suas unidades de Pronto Socorro e Enfermaria de Pediatria por um período de um ano (05/2014-04/2015). Após o atendimento pelo clínico pediatra, que inclui anamnese e exame físico, o caso será definido como sintomático de infecção respiratória aguda viral (IRA) aquele que apresentar sinais e sintomas, com comprometimento de leve a grave e com início de até cinco dias de febre, coriza/espirros, tosse, dispnéia e sibilância. Para cada caso sintomático, um caso assintomático pareado por data de nascimento (+/- 6 meses) e sexo, será selecionado aleatoriamente a partir de uma lista de potenciais participantes (assintomáticos para infecções respiratórias ou qualquer outra doença infecciosa contagiosa) no mesmo dia e unidade em que for selecionado o caso sintomático. Uma visita diária do pesquisador será realizada objetivando buscar prováveis casos para atender o tamanho da amostra, que será composta por 400 indivíduos, sendo 200 de casos sintomáticos e 200 de assintomáticos, através da estimativa de prevalência de infecções respiratórias. A

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Lásio Universitário CEP: 74.605-000
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8238 Fax: (62)3269-8438 E-mail: cep@ufg@yahoo.com.br

Continuação do Protocolo: 1.310.662

população atendida neste hospital de referência em pediatria representa a amostragem da população acometida para estas doenças na cidade de Goiânia/ região Centro-Oeste. Seguindo um adequado preenchimento de protocolo do estudo proposto (coleta de dados e fluxo das amostras). As amostras serão coletadas conforme descrito por Lambert e cols (2008). Para os lavados, 1 mL de solução salina estéril será instilada em cada

narina e na sequência aspirado com sonda estéril, armazenando o produto em tubo também estéril e fechado adequadamente. Os swabs serão coletados e armazenados em tubo também estéril contendo meio MEM, fechado e identificado adequadamente. As amostras serão conservadas e transportadas refrigeradas (gelo 4°-8°C) em até duas-quatro horas para o Laboratório de Virologia Humana do IPTSPA/UFMG, onde serão imediatamente processadas e estocadas a -70°C, até a realização dos ensaios laboratoriais necessários. Em seguida serão submetidas a triagem molecular utilizando quatro reações de multiplex-PCR para investigação de vírus do trato respiratório.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a prevalência e a relação dos principais vírus do trato respiratório como possíveis agentes etiológicos de infecção aguda do trato respiratório através de um estudo realizado em crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia, durante o período de um ano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será explicado de forma clara e através de figuras como será realizado a coleta da secreção nasal pela pesquisadora responsável, assim como esclarecer riscos e benefícios. Em relação a riscos, para a coleta de secreção nasal, está será através de lavado ou swab nasal realizado pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica), podendo ocorrer desconforto e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posterior para as crianças. O procedimento de coleta da amostra clínica utilizando swab geralmente é indolor e não provoca sangramento, entretanto, o procedimento pode gerar um leve desconforto. Na ocorrência desse fato, caso a criança se sinta desconfortável, o pesquisador avaliará o tempo para o término do procedimento e a coleta poderá ser interrompida.

Benefícios:

Também será explicado aos pais e/ou responsáveis pelas crianças (objetos de estudos da pesquisa) a importância de sua participação neste estudo visando aumentar o conhecimento a respeito dos vírus respiratórios, onde sua ocorrência nesta população é elevada, por conseguinte, espera-se com nossos resultados a ampliação de medidas mais eficientes de controle para estas infecções, bem como a diminuição do uso desnecessário de medicamentos como antibióticos.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Lúcia Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8398 Fax: (62)3269-8436 E-mail: cep@ufg.br

Continuação do Parecer: 1.310.663

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem descrito, os pesquisadores apresentam formação e qualificação adequadas para o estudo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatórios estão presentes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HCUFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HCUFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HCUFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativo de Ausência	TCLE.pdf	09/10/2014 14:38:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Trato Respiratorio.pdf	09/10/2014 14:39:40		Aceito
Outros	Declaração para obter o TCLE.pdf	09/10/2014 14:40:22		Aceito
Outros	Certidão - aprovação IPTSP.pdf	09/10/2014		Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leite Universitário CEP: 74.605-000
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefones: (62)3266-8338 Fax: (62)3266-8408 E-mail: cep@ufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.311083

Outros	Certidão - aprovação IPTSP.pdf	14:41:26		Aceito
Outros	Curriculo_lattes_pesquisadores.pdf	09/10/2014 14:41:47		Aceito
Outros	Termo de Anuencia 1.pdf	09/10/2014 14:42:19		Aceito
Outros	Termo de Anuencia 2.pdf	09/10/2014 14:42:39		Aceito
Outros	Termo de Anuencia 3.pdf	09/10/2014 14:44:16		Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	09/10/2014 14:45:08		Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_2.pdf	09/10/2014 14:45:32		Aceito
Outros	Questionario aplicado na entrevista.pdf	09/10/2014 14:46:18		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	09/10/2014 14:46:51		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	09/10/2014 14:54:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Trato Respiratorio_versao2.pdf	22/01/2015 11:05:07		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE PRORESP_versao2.pdf	22/01/2015 11:05:18		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	22/01/2015 12:11:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PRORESP_versao3_07.04.2015. pdf	07/04/2015 16:44:18		Aceito
Outros	Carta_de_atendimento_de_pendências (1).pdf	07/04/2015 16:44:32		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	07/04/2015 16:44:54		Aceito
Outros	TCLE PRORESP_versao3.pdf	29/07/2015 08:51:08		Aceito
Outros	Carta de atendimento de pendências_2.pdf	29/07/2015 08:51:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	29/07/2015 08:53:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: S. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8436 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.210.862

Não

GOIANIA, 01 de Setembro de 2015

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefones: (62)3269-8238 Fax: (62)3269-8438 E-mail: cephcutg@yahoo.com.br

Página 08 de 08

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do projeto de pesquisa: Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle.

Pesquisador responsável: Teresinha Teixeira de Sousa

Orientadora: Profa. Divina das Dores de Paula Cardoso.

Nome do sujeito de Pesquisa:.....

Você autoriza a criança a participar de uma pesquisa, em que ela, seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável está sendo convidado (a) como voluntário(a) a fazer parte deste estudo que tem como título: **“Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle”**.

Meu nome é Teresinha Teixeira de Sousa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é de médica pneumologista, aluna de doutorado da UFG/IPTSP. A participação da criança é importante, mas antes de decidir se você quer que ela faça parte da pesquisa em que é preciso coletar fezes e secreção do nariz de crianças doentes (com infecções respiratórias e com gastroenterite-diarreia) e também daquelas sem estas doenças (que é o grupo controle, estudar a presença do vírus em quem não está doente), é preciso que o senhor ou a senhora, entenda o motivo da pesquisa: o convite esta sendo feito porque os vírus respiratórios e entéricos são causas comuns de infecções respiratórias e de gastroenterite em crianças.

Vários novos vírus estão sendo descobertos e pouco se conhece sobre seu impacto (importância) em pacientes com essas doenças. Esta pesquisa pretende estudar as infecções respiratórias e gastroenterite por vírus (bocavírus humano/HBoV) em crianças com idades abaixo de 5 anos. Durante o período de um ano atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia/Goiás. A pesquisa será realizada em crianças com sintomas clínicos (casos) de infecção respiratória e/ou gastroenterite e comparar o vírus também em pacientes sem estas doenças (que é o grupo controle, onde estudamos o vírus também em quem está sadio, pois em alguns casos a criança pode ser portadora dos vírus, mas não manifestar a doença). Após o atendimento do paciente pelos pediatras do hospital, um dos membros da equipe pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis pelas crianças e explicará em detalhes todos os procedimentos para a pesquisa: haverá o preenchimento de um questionário e uma coleta de cada material (secreção nasal e fezes), em todas as crianças tanto as doentes como as sadias que estão no hospital por outros motivos. Todos estes procedimentos serão feitos pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica) em sala ao lado do ambulatório no térreo e sala procedimentos no segundo andar / enfermarias do Hospital Materno Infantil, onde será garantida a privacidade da criança, por ocasião das consultas e/ou hospitalização, sem a necessidade de comparecimento ou retorno ao Hospital por motivo relacionado à Pesquisa.

Os exames de fezes e secreção nasal não substituirão os exames regularmente colhidos no Hospital como parte do seguimento médico dos pacientes. A participação de seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável é importante, mas você e a criança podem recusar participar da pesquisa a qualquer momento. Os procedimentos apresentam riscos baixos à integridade física da criança, serão realizados pela pesquisadora (Teresinha) e consistem em: Coleta de lavado nasal é feita através de uma pequena sonda com soro fisiológico, introduzida nas narinas e aspirada (“como uma lavagem do nariz com soro, só que aspirado o líquido de volta”), podendo ocorrer desconforto local e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posteriormente para a criança. E a

coleta de fezes é espontânea, durante a evacuação, a qual será recolhida em um frasco específico, sem a utilização de medicação ou instrumentos para tal. Não acarretando nenhum desconforto direto, podendo ser acompanhado pelo responsável legal da criança. Além da coleta das amostras de secreções nasais e de fezes, o responsável pela criança deverá responder um questionário para o registro das informações pessoais da criança e a pesquisadora poderá, também, anotar dados dos prontuários. O destino dessas amostras será para o Laboratório de Virologia Humano da UFG/IPTSP, onde por exames moleculares os vírus respiratórios e entéricos serão detectados através de técnicas laboratoriais sofisticadas chamadas de PCR em tempo real (material genético dos vírus, DNA e RNA).

Informo, aos pais ou responsáveis pela criança, que as amostras (material biológico de fezes e de secreções nasais) ficarão armazenadas (guardadas) no Instituto de Patologia e Doenças Tropicais da UFG seguindo todas as normas do regulamento aprovado pelo CEP/IPTSP a respeito de biorrepositório (segundo as normas da resolução do CNS 441 de 2011), e, caso eu tenha seu consentimento por escrito autorizando o uso para esta pesquisa e no futuro para qualquer outra pesquisa, não será necessário preencher um novo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); sobre o bocavírus humano e também para os outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichivírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1. Esta pesquisa estará sendo financiada com recurso do próprio laboratório e de convênios regularmente firmados sem nenhum custo para o SUS, familiares ou planos de saúde. É importante ressaltar, entretanto que a pesquisa está restrita aos procedimentos listados acima.

A participação no estudo NÃO IMPLICA na realização de outro exame e NÃO INTERFERE nas decisões sobre os remédios necessários para o tratamento do problema atual (o médico do hospital que atender seu filho (a) decidirão por procedimentos necessários, como os medicamentos ou outros exames). Estes dados procedimentos e/ou seus resultados, entretanto serão registrados para análise futura. Todos os pacientes serão convidados a participar do estudo, e a qualquer momento podem também deixar de participar, se assim o desejarem. Somente os pesquisadores e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de suas identidades e do questionário. Os pesquisadores pretendem publicar os resultados obtidos pela pesquisa, mas o nome e dados pessoais dos pacientes são TOTALMENTE CONFIDENCIAIS (não haverá identificação dos participantes) os dados também poderão ser utilizados em estudos futuros de outros vírus citados acima.

Em caso de recusa, você e seu filho (a) não serão penalizados (as) de forma alguma, esta recusa em nada implicará na assistência que seu filho (a) receberá. Se aceitar participar e depois retirar seu consentimento também, em nada será prejudicado. É importante destacar que, como não há despesas decorrentes da participação na pesquisa por parte do sujeito da pesquisa, neste caso, o responsável legal e a criança participante não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Este estudo tem início no ano de 2013 e previsão de encerramento em 2014.

Autorizo o armazenamento e guarda de amostras de secreção nasal e de fezes, formando um banco de dados/biorrepositório para investigações futuras, e que toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da CONEP e com a dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (Res. CNS n.o 347/2005-1.1, 1.2, 1.3, 1.4).

Após receber os esclarecimentos e as informações, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá rubricar todas as páginas e assinar ao final deste documento e, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável A qualquer

momento, antes e durante a pesquisa, você poderá solicitar esclarecimentos e em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Teresinha Teixeira de Sousa no telefone: (62) 81595675. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil de Goiânia Telefone (62) 3201-3374.

Local e Data: Goiânia,/...../.....

Nome e Assinatura do pesquisador _____

Consentimento da participação da criança como sujeito da pesquisa pelo responsável legal

Eu, _____, RG _____, CPF _____, endereço _____, abaixo assinado concordo que _____ cuja responsabilidade legal me é conferida autorizo que a criança participe do estudo **"Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias e/ou gastroenterite: estudo caso-controle"**, como sujeito de pesquisa.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo Pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim com os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação da criança pela qual sou responsável legal.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do seu acompanhamento assistência/tratamento e que todas as informações pessoais obtidas serão mantidas em sigilo. Recebi uma cópia deste documento com todas as páginas rubricadas e assinadas por mim e pelo pesquisador participante deste estudo. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo sobre o bocavírus humano e, ainda, a formação de um banco de dados e um biorrepositório das amostras (fezes e de secreções nasais) cujo regulamento foi aprovado pelo CEP/IPTSP/UFG, seguindo as normas da resolução do CNS 441 de 2011. E que as amostras obtidas poderão ser utilizadas em pesquisas futuras sem a necessidade do preenchimento de um novo termo de consentimento (TCLE); para o bocavírus humano e para outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichi vírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável legal: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas

Nome e assinatura: _____

Nome e assinatura: _____

Anexo 3. Ficha de Investigação Clínica

Ficha de investigação clínica.

DATA:/...../..... Registro geral (.....) N° Amostra (.....)

- | | | | |
|----|-----------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1. | Controle: | 1.1 Fezes assintomático () | 1.2 Swab assintomático () |
| 2. | Caso: | 2.1 Sintomas GEA () | 2.2 Sintomas respiratórios () |
| 3. | Amostra: | 3.1 Fezes () | 3.2 Swab () |

Dados epidemiológicos

4. NOME:
5. COLETA: DATA (...../...../.....) HORA (.....)
6. UNIDADE COLETA: () PS () ENFERMARIA ADMISSÃO:
7. SEXO: () MASC. () FEM.
8. DATA DE NASCIMENTO:/...../..... **IDADE:**

9. Natural: Procedência:

Endereço:

Bairro:..... Cidade:..... UF:.....

Telefone: ()..... Nome responsável:

Profissão: Mãe Pai.....

Renda familiar (em salário mínimo):

Habitação: () própria () alugada

Asfalto: sim() não() Água: ()tratada ()cisterna ()poço Esgoto: sim() não()

10. RAÇA/COR: ()branca, ()morena, ()negra, ()indígena
11. ESCOLARIDADE: () pública, () creche, () particular
12. ASSISTÊNCIA MÉDICA: () SUS, () plano de saúde, () particular
13. ALIMENTAÇÃO: () leite materno, () leite materno e outro, () outro
14. TIPO PARTO: () normal, () cesariana

Sintomatologia:

15. A. Respiratório:
- Febre: sim() não(), Tosse ()sim ()não, Dispnéia/Chiado ()sim ()não
- SaO2:...../ Rad TX:...../ HMG:
- Ausulta:/ Temperatura:

B. GASTROENTERITE:

Diarréia: sim() não()/ Freqüência: 1 a 2x (), >2x ()
Aspecto: líquida(), semi-líquida(), pastosa(), sangue(), fétida()
Febre: sim() não()/ Vômitos: sim() não()/ Dor abdominal: sim() não()

Antecedentes epidemiológicos:

16. Contato caso suspeito (Respiratório e/ou GEA): ()domicílio, ()creche, () escola

17. Uso de medicação antes coleta: sim() não(), qual?

18. Vacinação completa: sim() não()

Vacina contra gripe: sim() não() Última dose:.....

Vacina rotavírus (VORH)(), Rotarix (), Rotatec() – 1ªdose(), 2ªdose ()

Comprovação: sim(), não()

19. Diagnóstico clínico

prontuário:.....

20. Outras patologias/cirurgias: