

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Imunologia/Doenças Infecto-Parasitárias

**Thais Aparecida Vieira Reis**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DIARRÉICA AGUDA  
ASSOCIADA AOS ADENOVÍRUS, EM JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS,  
NO PERÍODO 2007-2010**

JUIZ DE FORA  
2012

**THAIS APARECIDA VIEIRA REIS**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DIARRÉICA AGUDA  
ASSOCIADA AOS ADENOVÍRUS, EM JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS,  
NO PERÍODO 2007-2010**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós  
Graduação em Ciências Biológicas. Área:  
Imunologia, para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas na área de Imunologia  
e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora**

**Profa. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva**

**JUIZ DE FORA  
2012**

Reis, Thais Aparecida Vieira.

Estudo epidemiológico da doença diarreica aguda associada aos adenovírus, em Juiz de Fora, Minas Gerais, no período 2007-2010 / Thais Aparecida Vieira Reis. – 2012.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia)—  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Epidemiologia. 2. Diarreia. 3. Adenovirus Humanos. I. Título.

CDU 616.-036.22

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Virologia  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental  
Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz/RJ

## **COLABORAÇÃO**

Dr. José Paulo Gagliardi Leite  
Silvana Augusta Rodrigues Portes

Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação  
Oswaldo Cruz/RJ

## **APOIO FINANCEIRO**

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**THAIS APARECIDA VIEIRA REIS**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DIARRÉICA AGUDA ASSOCIADA AOS  
ADENOVÍRUS, EM JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS, NO PERÍODO 2007- 2010**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luzia da Rosa e Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivianne Weil Afonso  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Leite  
Fundação Oswaldo Cruz

A todas as crianças que, de alguma forma, poderão ser beneficiadas com trabalhos como este.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e por estar, neste momento, concluindo mais uma etapa .

Aos meu pais, que no seu jeito simples e bondoso de ver a vida, valorizaram e possibilitaram a minha formação profissional. À minha irmã, agradeço pela amizade, apoio e incentivo constantes.

À minha orientadora, Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva, agradeço por tudo que me ensinou, pela paciência, interesse, dedicação extrema, amizade e apoio, que foram fundamentais para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao amigo Daniel, pela paciência, pelos ensinamentos constantes e fundamentais, durante a realização deste estudo.

Às amigas Vivian e Andressa, pelo companheirismo, mesmo que em momentos diferentes desta etapa, e por todos os conselhos, ensinamentos e incentivos que me deram.

Aos estagiários do laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todo o auxílio que me prestaram.

Aos grandes amigos Larissa e Andrei, pelo carinho e generosidade de sempre, em especial por terem me recebido em sua casa durante a realização dos experimentos deste trabalho, no Rio de Janeiro.

À Dra. Sandra Tibiriçá, pela contribuição fundamental com a doação de amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da Fiocruz-RJ, e ao doutor José Paulo Gagliardi Leite, por fornecerem meios para a realização dos experimentos.

À Silvana Portes, à Tatiana Rose e à Betânia Drummond, pela boa vontade, paciência e ensinamentos sobre as sequências.

À coordenação de Pós-graduação em Ciências Biológicas e aos professores do programa, por terem contribuído para a minha formação.

À FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, que possibilitou a concretização dos ensaios e a minha dedicação à realização deste estudo.

## RESUMO

A doença diarréica aguda (DDA) é, ainda hoje, uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, nos países em desenvolvimento. Na diarreia aguda não bacteriana, os adenovírus entéricos constituem um dos importantes agentes etiológicos da doença. Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família *Adenoviridae* e ao gênero *Mastadenovirus*, cujos membros estão classificados em 7 espécies (A-G) e 54 sorotipos. Dentre estes, os sorotipos 40 e 41, ambos da espécie F, são os mais comumente associados com a DDA. Considerando-se, então, a importância da DDA em países em desenvolvimento, o grande número de casos que não são esclarecidos e o pouco conhecimento sobre a infecção e a participação dos HAdV na gênese da DDA, em Juiz de Fora, Minas Gerais, foi realizado o presente estudo. Entre janeiro de 2007 e dezembro de 2010, foram analisados 395 espécimes fecais diarréicos, provenientes de indivíduos de várias idades, atendidos em serviços ambulatoriais e hospitalizados. A presença dos HAdV foi detectada pela reação de PCR, utilizando-se os iniciadores específicos e a caracterização molecular das amostras positivas foi feita pelo seqüenciamento e análise filogenética das sequências parciais do gene do Hexon. Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa SPSS versão 13.0, tendo-se adotado um valor de significância como  $p < 0,05$ . A prevalência da infecção por HAdV, no período 2007-2010, foi de 10,9% (43/395). Os resultados mostraram que não houve correlação significativa entre a procedência da amostra (ambulatorial X hospitalar) e a ocorrência da infecção ( $p=0,152$ ), o mesmo tendo sido observado em relação ao gênero do indivíduo infectado ( $p=0,393$ ). Por outro lado, a maioria dos casos positivos foi detectada em crianças de até 24 meses de idade, mostrando uma correlação estatisticamente significativa entre a idade dos indivíduos infectados e a ocorrência da infecção ( $p=0,007$ ). Na maioria dos casos de infecção pelo HAdV (36/43), este foi o único agente viral detectado, no entanto, foram observados casos de coinfeção HAdV/Rotavirus (5/43) e HAdV/Norovirus (2/43). A análise filogenética das sequências parciais do gene do Hexon, de 35 amostras positivas, revelou que todas agruparam com amostras de HAdV da espécie F, sorotipo 41, confirmando assim, a associação de HAdV entéricos, nos casos estudados. Este levantamento epidemiológico revelou a presença e a circulação destes vírus na população de Juiz de Fora, no período avaliado, bem como sua importante participação na gênese da DDA, permitindo assim, esclarecer uma boa parte dos casos da doença, que normalmente ficaria sem definição etiológica.

Palavras chave: Adenovírus Humano, Diarreia, Estudos Epidemiológicos, PCR, Análise de Seqüência de DNA

## ABSTRACT

Acute diarrheal disease (ADD) is still the major cause of child morbidity and mortality in developing countries. Among the non-bacterial diarrhea, enteric adenoviruses are one of the most important etiologic agents of disease. Human adenoviruses (HAdV) belongs to the Adenoviridae family and Mastadenovirus genus. The virus are classified into seven species (A-G) and 54 serotypes. Among them, serotypes 40 and 41, both of the species F, are the most commonly associated with ADD. Taking in consideration the importance of the DDA in developing countries, the large number of cases that don't have the etiologic agent identified and the lack of knowledge about the participation of HAdV infection and the pathogenesis of ADD, we performed this study in Juiz de Fora, Minas Gerais. Between January of 2007 and December of 2010 395 diarrheal fecal specimens originating from individuals of various ages treated in ambulatory and hospitalized were analyzed. The presence of HAdV was detected by PCR, using specific primers, and molecular characterization of positive samples was performed by sequencing and phylogenetic analysis of partial sequences of the hexon gene. For statistical analyzes, we used SPSS version 13.0, adopting a value of  $p < 0.05$  as significant. The prevalence of infection by HAdV between 2007-2010 was 10.9% (43/395). The results showed no significant correlation between the origin of the sample (hospital X ambulatory) and the occurrence of infection ( $p = 0.152$ ), and the same was observed in relation to gender of the infected person ( $P=0,393$ ). Moreover, the majority of positive cases was detected in children under 24 months of age, showing a statistically significant correlation between the age of the infected individuals and the occurrence of infection ( $p=0,007$ ). In most cases of infection HAdV (36/43), this was the only viral agent detected, however, cases of co-infection HAdV / Rotavirus (5/43) and HAdV /Norovirus (2/43) were identified. Phylogenetic analysis of partial sequences of the hexon gene from 35 positive samples revealed that all samples clustered with HAdV species F, serotypes 41, confirming the association of enteric HAdV in the cases of this study. This epidemiological survey revealed the presence and circulation of these viruses in the population of Juiz de Fora in the period studied, as well as its important role in the genesis of the DDA, our data identified a good number of cases of the disease, which normally remains unidentified.

**Keywords:** Human Adenovirus, Diarrhea, Epidemiologic Studies, PCR, DNA sequence analysis.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Algumas características dos sorotipos de adenovírus .....	18
Quadro 2: Localização e função das proteínas dos HAdV .....	22
Quadro 3- Características dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR para detecção de HAdV. ....	44
Quadro 4: Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase.....	47
Tabela 1: Detecção de HAdV, em Juiz de Fora, no período 2007-2010.....	50
Tabela 2: Distribuição mensal e anual das amostras testadas e positivas e a prevalência anual das infecções para HAdV , em Juiz de Fora, no período 2007-2010.....	52
Tabela 3: Procedência das amostras testadas para adenovírus, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. (p=0,152) .....	53
Tabela 4: Distribuição das amostras positivas, por faixa etária, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. ....	54
Tabela 5: Coinfecção de HAdV com NoV, RV, HAstV, por ano.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos adenovírus. ....	19
Figura 2: Esquema do capsídeo dos adenovírus. ....	20
Figura 3: Proteínas dos adenovírus e sua interação com receptores. ....	25
Figura 4: Sequencia dos eventos associados à desmontagem das partículas de ADV2 durante a entrada na célula. ....	26
Figura 5: Vírus e fibra são liberados na superfície basolateral . A fibra aumenta a permeabilidade paracelular por competir com a adesão célula-célula mediada por CAR. ....	28
Figura 6: Ação dos adenovírus no intestino. ....	30
Figura 7: Microscopia eletrônica mostrando partículas de HAdV ....	31
Figura 8: Gel de agarose para detecção de HAdV. ....	51
Figura 9: Distribuição por gênero de amostras positivas, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. (p=0,393).....	53
Figura 10: Percentual acumulado das amostras positivas para HAdV em relação à faixa etária, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. ....	55
Figura 11:: Distribuição mensal das amostras positivas para HAdV e valores médios de temperatura e precipitação no município de Juiz de Fora em 2007(A), 2008 (B), 2009 (C) e 2010 (D). ....	57
Figura 12: Árvore filogenética, baseada na sequência de nucleotídeos do gene do hexon, de amostras de HadV isoladas de crianças de Juiz de Fora, Minas Gerais, entre 2007 e 2010.....	60
Figura 13: Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos o gene do hexon de amostras de HadV isoladas de crianças de Juiz de Fora, Minas Gerais, entre 2007 e 2010.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: *Adenovirus death protein*- proteína letal dos adenovírus  
ADPol: Polimerase dos adenovírus  
AdV: Adenovírus  
CAR: Receptor para Adenovírus e Coxsakievírus  
CEPH-UFJF: Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora.  
DBP: *DNA binding protein*- proteína de ligação ao DNA  
DDA: Doença Diarréica Aguda  
DMPI/ICB-UFJF: Departamento de microbiologia, parasitologia e imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.  
DNA: Ácido desoxirribonucléico.  
EIE: Ensaio Imunoenzimático.  
EIERA: Ensaio Imunoenzimático para Rotavírus e Adenovírus  
EDTA: ácido etilenodiamino tetracético  
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz.  
HAdV: Adenovírus Humano.  
HAdVF: Adenovírus Humano da Espécie F.  
HAdV40: Adenovírus Humano Sorotipo 40.  
HAdV41: Adenovírus Humano Sorotipo 41.  
HAsTV: Astrovírus humanos  
HCL: Ácido clorídrico  
HeLa: Células de Carcinoma do Útero Humano.  
HEK293: Células de rim embrionário humano  
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida.  
IF: Imunofluorescência.  
IH: Inibição da Hemaglutinação.  
Kb: quilobases  
NoV: Norovírus  
NPC: Complexo do Poro Nuclear.  
Pb: Pares de bases  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.  
Ptp: Precursor da proteína terminal  
RNA: Ácido ribonucléico  
RPM: Rotações por minuto  
RV: Rotavírus  
SRO: Sais de Reidratação Oral.  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
TN: Teste de Neutralização  
TRO: Terapia de Reidratação Oral.  
TP: Proteína terminal.  
VA RNA: Ácido Ribonucleico associado aos vírus

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 ADENOVÍRUS.....	17
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA.....	17
2.1.2 BIOSÍNTESE VIRAL.....	22
2.1.3 PATOLOGIA E PATOGENIA.....	29
2.1.4 DIAGNÓSTICO.....	30
2.1.5 EPIDEMIOLOGIA.....	33
2.1.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	37
2.1.6 RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 MATERIAIS.....	42
4.1.1 ÁREA ESTUDADA.....	42
4.1.2 ESPÉCIMES FECAIS.....	43
4.1.3 DADOS CLIMATOLÓGICOS.....	43
4.1.4 AMOSTRAS CONTROLE.....	44
4.1.5 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DEGENERADOS.....	44
4. 2 MÉTODOS.....	45
4.2.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS.....	45
4.2.2 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	45
4.2.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO ADENOVÍRUS.....	46
4.2.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE DO HEXON PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE E DO SOROTIPO DOS ADENOVÍRUS.....	48
4.2.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS.....	49
4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS.....	50
6 DISCUSSÃO.....	63

7 CONCLUSÕES.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICE A - COMPOSIÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	79

# 1 INTRODUÇÃO

A doença diarréica aguda (DDA) é uma síndrome cuja principal manifestação é o aumento do número de evacuações (mais de três por dia), com fezes aquosas ou de pouca consistência, em alguns casos com muco e sangue e que pode ser acompanhadas de náusea, vômito, febre e dor abdominal. No geral é uma doença auto-limitada, apresentando-se sob formas que variam de leves a graves, sendo que, nestas últimas, os distúrbios eletrolíticos podem acarretar em desidratação, principalmente quando associadas com a desnutrição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

As primeiras estimativas sobre a carga global de morbidade e mortalidade infantil tornaram-se disponíveis no início dos anos 1980, quando a DDA foi considerada a principal causa de mortalidade infantil, responsável por cerca de 4,6 milhões de mortes, a cada ano, em todo o mundo. Nesta época, aproximadamente 1 bilhão de episódios de diarreia ocorriam entre as crianças menores de cinco anos. Após uma década, o número de mortes atribuíveis à DDA caiu para 3,3 milhões por ano, embora não tenha havido muitas mudanças na ocorrência da doença. Apesar do uso generalizado da terapia de reidratação oral (TRO) e do maior conhecimento sobre a patogênese da DDA, esta doença é, ainda hoje, uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil. Estimativas recentes sugerem que 1,5 milhões de crianças morrem por esta doença, principalmente nos países em desenvolvimento (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), os quais apresentam dificuldade de acesso à água potável (1,1 bilhão de pessoas não tem acesso à água potável), precariedade no saneamento básico (2,4 bilhões não possuem saneamento) e altas taxas de desnutrição infantil (aproximadamente, um quarto das crianças estão desnutridas) (THAPAR E SANDERSON, 2004).

As deficiências em macro ou micronutrientes em crianças estão relacionadas com quadros de diarreia mais graves e persistentes. A deficiência do zinco, por

exemplo, está associada ao aumento da prevalência da diarreia persistente, a qual, por sua vez, pode resultar em má absorção, o que configura um verdadeiro ciclo, ou seja, um estado nutricional ruim implica em risco elevado de morte pela doença. Caso essa realidade seja transformada, a incidência da diarreia e a mortalidade causada pela doença podem diminuir (GUIA PRÁTICO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2008).

A DDA pode ser de origem não infecciosa - como a causada por intolerância à lactose, glúten e outros - ou de origem infecciosa. Em termos de saúde pública, a de maior importância é a doença de origem infecciosa, que pode ser causada por parasitos, protozoários, bactérias e suas toxinas e os vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No que diz respeito à etiologia viral de DDA, embora os rotavírus (RV) e os norovírus (NoV) sejam os agentes causais mais conhecidos, outros vírus podem estar implicados, dentre eles os adenovírus entéricos (PARASHAR et al., 1998; FILHO et al., 2007).

No Brasil, dados do DATASUS relativos ao ano de 2009, indicaram que a DDA foi responsável por 2,5% da mortalidade infantil, sendo que o número total de óbitos em crianças foi de 50.033 e o número de óbitos, por DDA, foi de 1.258 (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c06.def>). Em Juiz de Fora, um estudo sobre a prevalência da DDA, em crianças hospitalizadas, revelou que esta doença foi a terceira causa de hospitalização infantil (ROCHA, 2010).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ADENOVÍRUS

#### 2.1.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA

A família Adenoviridae, à qual pertencem os adenovírus, é subdividida em cinco gêneros: *Mastadenovirus*, constituído por vírus isolados de mamíferos; *Aviadenovirus*, composto por vírus isolados de aves; *Atadenovirus*, gênero assim denominado pelo seu alto teor de adenosina-timina e formado por vírus isolados de répteis, aves e mamíferos; *Siadenovirus*, constituído por vírus isolados de aves e répteis, e *Ichtadenovirus*, que foi aceito pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV-International on Taxonomy of Viruses) em 2009, e é composto pelo vírus do esturjão (BERK, 2007; <http://www.vmri.hu/~harrach/Taxonomy.htm>).

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, o qual consiste de 54 sorotipos, que são classificados em sete espécies (A-G) (<http://www.vmri.hu/~harrach/AdVtaxshort.htm>), baseadas na sua habilidade de aglutinar células vermelhas do sangue (JONES II et al., 2007). Outros esquemas de classificação são explorados, como o potencial de oncogenicidade em roedores, mobilidade eletroforética das proteínas virais, similaridade do genoma, além do percentual de bases (G+C), número de genes VA RNA (*RNA vírus-associated*) que codificam moléculas de RNA associadas aos HAdV e a organização genética da região E3 (BERK, 2007; SIQUEIRA-SILVA, 2008). (Quadro 1)

Quadro 1: Algumas características dos sorotipos de adenovírus

	<b>Espécie A</b>	<b>Espécie B</b>	<b>Espécie C</b>	<b>Espécie D</b>	<b>Espécie E</b>	<b>Espécie F</b>	<b>Espécie G</b>
<b>Sorotipos</b>	12, 18, 31	3,7,11,14,16, 21,34,35,50	1,2,5,6	8,10,13,15,17,19,20,22-30, 32,33,36-39, 42-47, 51, 53,54	4	40,41	52
<b>Oncogenicidade</b>	Alta	Fraca	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	-
<b>Receptor da Fibra</b>	CAR	CD46, CD80 e CD86	CAR, VCAM1, Sulfato de heparana	CAR, Ácido siálico	CAR	CAR <sup>1</sup>	-
<b>Nº de genes VA RNA</b>	1	2(B1), 1(B2)	2	2	2	1	-
<b>Motivos reconhecidos pela base do penton<sup>2</sup></b>	RGD	RGD	RGD	RGD	RGD	RGDA(40) IGDD(41)	-
<b>Comprimento da fibra(repetição dos motivos)</b>	22	6(B1) 6(B2)	22	8	12	Longa21-22 Curta 12	-
<b>Tropismo</b>	Entérico	Respiratório(B1), Renal (B2)	Respiratório	Ocular	Ocular Respiratório	Entérico	-
<b>Síndromes</b>	DDA	Respiratória aguda, Infecções renais persistentes	Respiratória Aguda	Conjuntivite Inaparente, Úlcera genital	Conjuntivite, Respiratória aguda	DDA infantil	-

1: Fibra longa da espécie F se liga ao CAR, mas a fibra curta não tem receptor conhecido

2: Motivos expostos na base do penton, através dos quais ocorre o reconhecimento das integrinas

Fonte: Modificado de SIQUEIRA-SILVA, 2008; <http://www.vMRI.hu/~harrach/AdVtaxshort.htm>

As partículas virais não possuem envelope e medem, aproximadamente, 90 nm de diâmetro. Apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, composto de 252 capsômeros, sendo 240 hexons e 12 pentons. O genoma é constituído de DNA de fita dupla, de 35 a 40 kb e codifica um proteoma de aproximadamente 45 proteínas, dentre as quais, pelo menos 11 constituem o vírion (II a IX, IIIa,  $\mu$ , TP e a protease viral p23) e sete desses polipeptídeos (II, III, IV, IIIa, VI, VIII e IX) formam o capsídeo viral (Figura 1) (CUSACK, 2005; BERK, 2007).

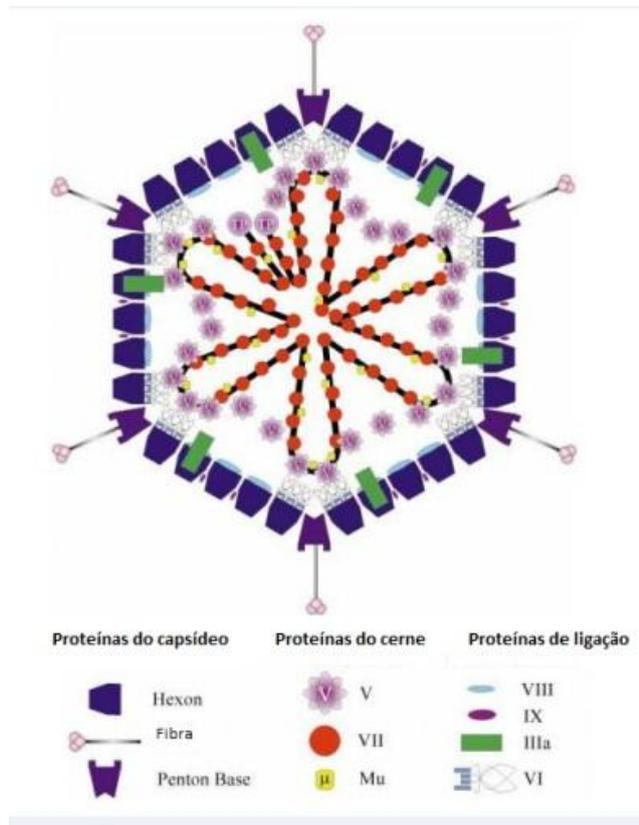


Figura 1: Estrutura dos adenovírus.  
Fonte : Adaptado de RUSSEL, 2000.

O hexon é a proteína estrutural mais abundante do capsídeo viral, formada por

um trímero do polipeptídeo II, unido por ligações covalentes, e é responsável por 63% da massa total de proteínas (RUX e BURNETT, 2004).

O complexo do penton é formado pela base do penton (um pentâmero do polipeptídeo III) e pela fibra (um trímero do polipeptídeo IV), selando o capsídeo viral em cada um dos doze vértices da partícula. A fibra é a proteína responsável pela ligação, enquanto a base do penton é responsável pela internalização do vírus, na célula hospedeira (RUX e BURNETT, 2004).

As fibras podem ser divididas em três domínios: uma cauda N-terminal, que a liga à base do penton, um eixo central com motivos repetidos de aproximadamente 15 resíduos, e uma cabeça globular C-terminal, que funciona como local de ligação à célula hospedeira (Figura 2). Há uma ampla variação no tamanho da fibra entre os sorotipos, devido às diferenças no número de sequências repetidas no eixo, que variam de 6 no Ad3 (SIGNAS, AKUSJARVI e PETERSSON, 1985) a 22 no Ad2 e Ad5 (GREEN et al., 1983).

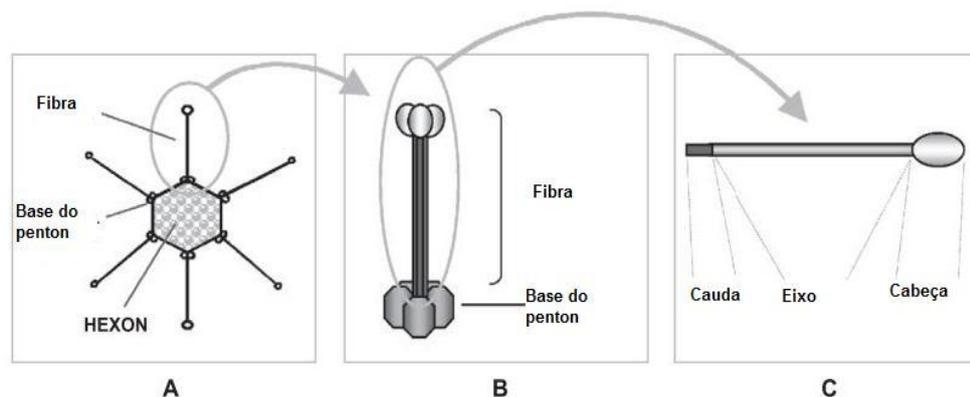


Figura 2: Esquema do capsídeo dos adenovírus.

A: Fibra, base do penton e hexon. B: Fibra ligada à base do penton C: Cauda, eixo e cabeça da fibra.  
Fonte: Adaptado de MEDINA-KAUWE, 2003.

O cerne da partícula viral contém cinco proteínas conhecidas e o genoma

viral. O DNA é condensado com proteínas básicas, ricas em arginina, como os polipeptídeos V (368 aminoácidos), VII (174 aminoácidos) e  $\mu$  (19 aminoácidos) (RUSSEL, LAVER e SANDERSON, 1968; HOSOKAWA e SUNG, 1976; ANDERSON, YOUNG e FLINT, 1989). Apenas no gênero *Mastadenovirus*, encontram-se moléculas do polipeptídeo V, as quais estão distribuídas na partícula, sendo que nos vértices, elas estão ligadas à base dos pentons e ao polipeptídeo VI, unindo o cerne ao capsídeo. O polipeptídeo VII (174 aminoácidos) é o mais encontrado no cerne, com mais de 800 cópias por vírion (RUX e BURNETT, 2004; SAN MARTIN e BURNETT, 2003). Evidências sugerem que este polipeptídeo forme dímeros que condensam o DNA em complexos de 90 a 150 pares de bases (pb) (NWANEGBO et al., 2004; VAYDA e FLINT, 1987). Uma proteína terminal (TP), de 671 aminoácidos, encontra-se covalentemente ligada à porção 5'-terminal do DNA viral (REKOSH et al., 1977). O cerne também contém, aproximadamente, 10 moléculas da protease cisteína viral p23, a qual cliva precursores de diversas proteínas virais (VII, VIII, IIIa e TP) durante a montagem, sendo esta atividade necessária para a maturação da partícula viral. Esta proteína também atua na desmontagem das partículas dentro do endossomo e na saída das mesmas para o citoplasma, durante a infecção (Quadro 2) (WEBER, 2003; VELLINGA, VAN DER HEIJDT e HOEBEN, 2005).

Quadro 2: Localização e função das proteínas dos HAdV

<b>Proteína</b>	<b>Localização</b>	<b>Função Conhecida</b>
<b>II</b>	Monômero hexon	Estrutural
<b>III</b>	Base do penton	Penetração
<b>IIIa</b>	Associado à base do penton	Penetração , montagem
<b>IV</b>	Fibra	Ligação ao receptor celular, Hemaglutinação
<b>V</b>	Cerne: associado ao DNA e a base do penton	Do tipo Histona, empacotamento(?)
<b>VI</b>	Peptídeo do hexon	Estabilização do capsídeo e do core, participa do rompimento da membrana do endossoma
<b>VII</b>	Cerne	Do tipo Histona
<b>VIII</b>	Peptídeo do hexon	Estabilização do capsídeo e do core, montagem da partícula(?)
<b>IX</b>	Peptídeo do hexon	Estabilização do capsídeo e do core, montagem da partícula(?)
<b>TP</b>	Genoma	Replicação do DNA viral
<b>M</b>	Cerne	Ligação ao DNA viral
<b>p23</b>	Cerne	Protease

Fonte: SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008

### 2.1.2 BIOSÍNTESE VIRAL

A infecção viral inicia-se através da ligação de proteínas virais a receptores da superfície de uma célula susceptível. A expressão dos receptores específicos é importante para determinar a susceptibilidade da célula à infecção e também para o

tropismo do vírus aos tecidos particulares (COYNE e BERGELSON, 2005). No que diz respeito ao fato dos diferentes tipos de HAdV apresentarem tropismo por diferentes tipos de tecidos, foi sugerido que seja resultante de interações com receptores celulares distintos (ROELVINK et al, 1998).

O ciclo de replicação dos AdV é baseado em estudos realizados com HAdV2 e HAdV5, ambos da espécie C. Este ciclo é dividido em duas fases que são separadas pelo início da replicação do DNA viral. Os eventos iniciais ocorrem assim que o vírus interage com a célula hospedeira. Estes eventos incluem adsorção, penetração, movimento das partículas virais, parcialmente descapsidadas, para o complexo do poro nuclear (NPC), transporte do DNA viral, através do NPC, para o núcleo e expressão de um grupo de genes iniciais. Os produtos dos genes iniciais medeiam a expressão dos demais genes virais e a replicação do DNA, induzem a progressão do ciclo celular, bloqueiam a apoptose e antagonizam as defesas antivirais do hospedeiro. Paralelo à replicação do DNA, a fase tardia do ciclo inicia-se com a expressão dos genes virais tardios e montagem da progênie viral. O ciclo infeccioso dura de 24 a 36 horas em células Hela ( cultura de células de carcinoma de útero humano). Ao final do ciclo, aproximadamente  $10^4$  partículas virais são produzidas por célula, com síntese de proteínas virais e DNA em excesso (BERK, 2007).

A proteína fibra dos HAdV é responsável pela ligação inicial do vírus aos receptores primários na superfície celular (FAVIER et al., 2002), sendo que a porção C-terminal da fibra confere a especificidade do reconhecimento ao receptor (ROELVINK et al., 1998). A maioria dos HAdV (espécies A,C, D , E, F) liga-se à célula hospedeira, através da interação da fibra com o receptor para adenovírus-coxsackievírus (CAR) (ALBINSSON e KIDD, 1999). CAR é uma proteína transmembrana que medeia interações célula-célula nas junções das células epiteliais, e é expressa também no coração, pâncreas, sistema nervoso periférico e central, próstata, pulmão, fígado (COYNE e BERGELSON, 2005; BERK, 2007).

Outros receptores podem ser usados por outras espécies de HAdV, como CD46 para alguns HAdV da espécie B (SIRENA et al., 2004); ácido siálico usado pelo Ad37

da espécie D (ARNBERG, PRING-ARKERBLON e WADELL, 2002); CD80 e CD86 usados pelo sorotipo 3 da espécie B (SHORT et al., 2004).

Uma peculiaridade na organização do genoma dos HAdV da espécie F (HAdV F) é a presença de diferentes genes, que codificam 2 fibras (uma longa e outra curta) (PIENIAZEK et al., 1990; KIDD et al., 1993). Os HAdV F expressam somente uma das duas fibras em cada vértice, sendo que somente as fibras longas se ligam ao receptor CAR (ROELVINK et al., 1998). A fibra curta não possui um receptor conhecido e sua função na infecção não está bem determinada, mas sugere-se que esta fibra e seu receptor estejam envolvidos com a alta seletividade destes sorotipos pelo intestino (MEIER e GREBER, 2004; BERK, 2007).

Após o contato inicial entre a fibra e o receptor específico, ocorre uma segunda interação entre o motivo RGD (Arg-Gly-Asp) da base do penton com as integrinas  $\alpha\beta 3$  e  $\alpha\beta 5$  da superfície celular (Figura 3) (ALBISSON e KIDD, 1999). Esta interação leva à remoção das fibras e a partícula é internalizada por meio de endocitose mediada por receptor, com a formação de vesículas revestidas por clatrina (MIYAZAWA et al., 2001; MEDINA-KAUWE, 2003)

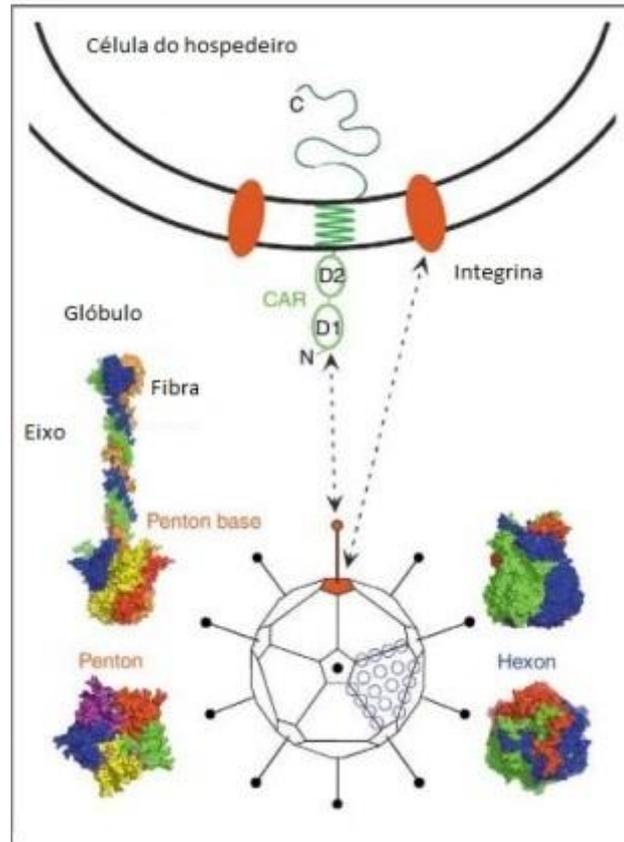


Figura 3: Proteínas dos adenovírus e sua interação com receptores.

Muitos sorotipos de Adenovírus ligam-se às células através da cabeça da fibra com o domínio extracelular de CAR, e a internalização necessita da interação da base do penton com integrinas celular.

Fonte: Adaptado de CUSACK, 2005.

Os HAdV F ( HAdV40 e HAdV41) apresentam motivos diferentes de RGD. A base do penton do HAdV40 possui um motivo RGAD (Arg-Gly-Ala-Asp) e o HAdV41, IGDD (Ile-Gly-Asp-Asp), porém, as proteínas celulares que interagem com eles são desconhecidas. Uma possível razão para a ausência de RGD, nos sorotipos entéricos, é que esta seja uma região potencialmente digerível pela tripsina (ALBINSSON e KIDD, 1999).

O processo de descapsidação inicia-se imediatamente após a absorção endocítica. As interações específicas estabelecidas entre as proteínas, durante a montagem do vírus, são sistematicamente quebradas. A alteração do pH, dentro do endossomo, provoca alterações conformacionais no penton, que expõe regiões hidrofóbicas, provocando a lise do endossomo. As partículas subvirais, sem as

fibras, escapam dos endossomos para o citosol, aproximadamente 15 minutos após a ligação à superfície celular. A desmontagem parcial do capsídeo continua concomitante com a liberação do endossomo. A exposição ao ambiente intracelular reduzido, no endossomo ou citosol, resulta na reativação da protease viral p23, que degrada a proteína VI, cuja função é ligar componentes do core ao capsídeo. Isto é necessário para a desmontagem final das partículas subvirais em direção ao complexo do poro nuclear, através do qual, o genoma é direcionado ao núcleo, onde os eventos da transcrição serão iniciados (Figura 4) (GREBER et al., 1993; RUSSEL, 2000, BERK, 2007).

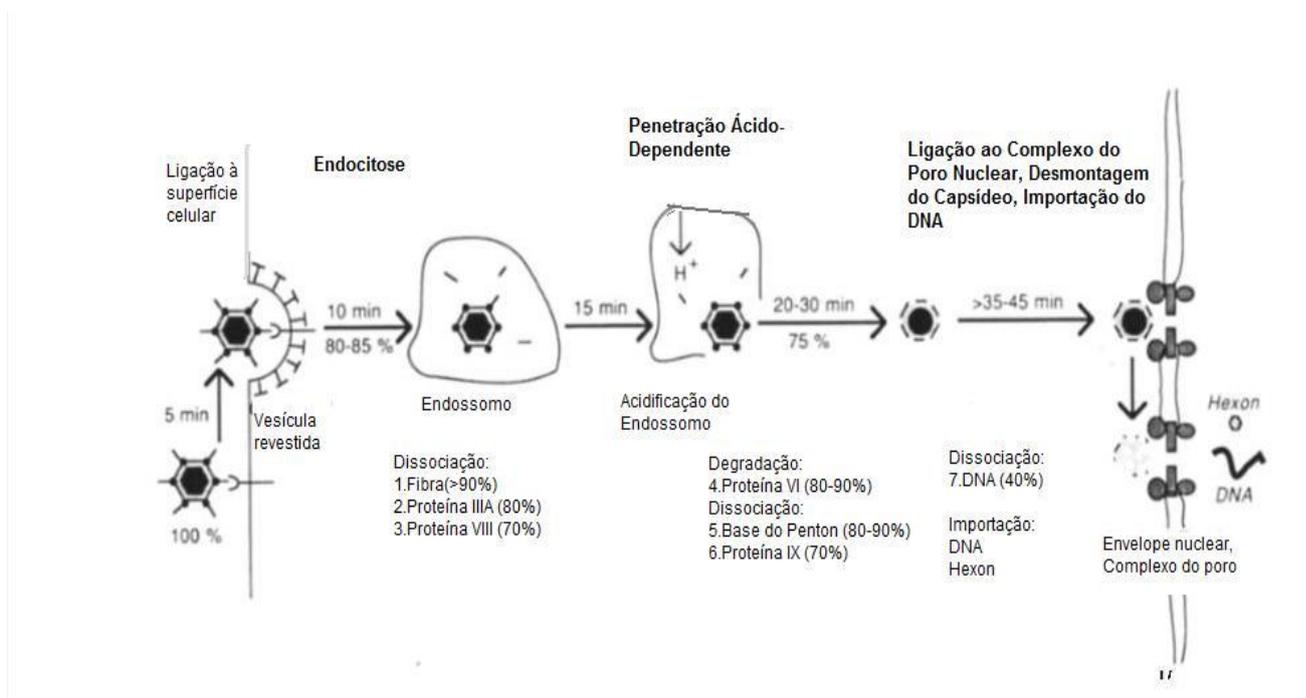


Figura 4: Sequencia dos eventos associados à desmontagem das partículas de ADV2 durante a entrada na célula. Fonte: Adaptado de GREBER et al., 1993).

Quando o DNA viral atinge o núcleo, a expressão dos genes precoces inicia-se com o gene E1A, a partir do qual são transcritos 5 RNAs, dos quais os mais estudados são os RNAs 12S e 13S, formados durante a fase inicial da infecção, os quais darão origem às proteínas não estruturais 243 e 289. Os demais RNAs transcritos do gene E1A acumulam-se na fase tardia da infecção e as funções distintas de seus produtos ainda não foram bem definidas (BERK, 2007).

Os produtos do gene E1A ativam a transcrição de outros genes e induzem a célula hospedeira quiescente a entrar na fase S do ciclo celular, proporcionando um ótimo ambiente para a replicação viral (BERK, 2007).

O gene E2 codifica três proteínas que participam diretamente da síntese de DNA viral: uma proteína de ligação ao DNA (DBP), DNA polimerase (ADPol), e o precursor da proteína terminal (pTP), a qual age como iniciadora da síntese de DNA viral (MEDGHALCHI, PADMANABHAN e KETNER, 1997).

O gene E3 codifica proteínas com função de subverter a resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, a proteína 19K, que se liga a moléculas de complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) no retículo endoplasmático, impedindo assim seu transporte para a superfície celular e o reconhecimento dos peptídeos virais pelos linfócitos T citotóxicos (RUSSEL, 2000).

O gene E4 codifica sete proteínas, das quais três estão relacionados à regulação da expressão do DNA viral (MEDGHALCHI, PADMANABHAN e KETNER, 1997). A proteína viral E4ORF6 bloqueia a função do fator de transcrição celular p53, o qual ativa genes apoptóticos (BERK, 2007).

Dado o início da replicação viral, tem-se a expressão dos genes tardios, responsáveis por codificar as proteínas estruturais. As regiões tardias estão organizadas dentro de uma grande unidade de transcrição, que sofre processamento para gerar cinco famílias de RNAs (L1 a L5). A expressão desta família de RNAs tardios é controlada pelo promotor tardio principal (MLP- *major late promoter*). Após o início da replicação viral, a unidade E2 é transcrita por um promotor alternativo, o promotor E2 tardio. Há também um ou dois genes VA (associado aos vírus)(depende do sorotipo) transcritos pela RNA polimerase III celular (BERK, 2007).

Grandes quantidades de polipeptídeos estruturais são produzidas no citoplasma. Hexons e pentons são importados para o núcleo, onde a montagem do

vírião ocorre. O DNA, associado com a proteína V e com os precursores das proteínas VII e  $\mu$ , é empacotado dentro do capsídeo. A clivagem dos precursores das proteínas VI, VII, VIII,  $\mu$  e TP, por uma protease viral, torna o vírião infeccioso (BERK, 2007).

São conhecidos três processos que facilitam a liberação dos vírus da célula infectada. Na fase tardia da infecção, a protease viral p23 cliva a citoqueratina celular K18, originando uma proteína que não é capaz de polimerizar e formar filamentos, o que torna a célula infectada mais susceptível à lise. O segundo processo envolve o acúmulo da proteína denominada E3 11.6 kd, também conhecida como ADP (*adenovirus death protein*- proteína letal dos adenovírus), no ciclo final da infecção, lisando a célula por um processo ainda desconhecido. O último processo está relacionado ao excesso de proteína fibra, que é liberada quando a célula é lisada e interfere com a oligomerização de CAR, nas junções comunicantes de células infectadas, desmembrando o epitélio, o que provavelmente, promove a liberação dos vírus no lúmen do trato respiratório (Figura 5) (CHEN, ORNELLES e SHENK, 1993; TOLLEFSON et al., 1996; WALTERS, FREIMUTH e MONINGER, 2002).

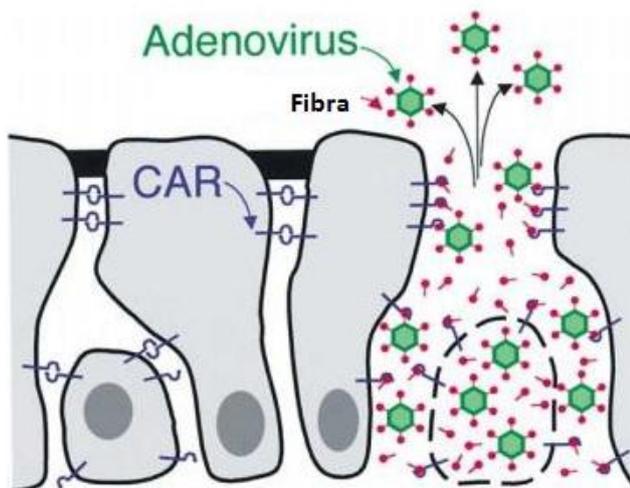


Figura 5: Vírus e fibra são liberados na superfície basolateral . A fibra aumenta a permeabilidade paracelular por competir com a adesão célula-célula mediada por CAR.  
Fonte: Adaptado de WALTERS, FREIMUTH e MONINGER, 2002.

### 2.1.3 PATOLOGIA E PATOGENIA

A DDA causada pelos adenovírus entéricos é uma doença auto-limitada, geralmente, de gravidade moderada, com duração de cinco a doze dias. Além da diarreia aquosa, podem ocorrer outros sintomas como vômitos, náuseas, dor abdominal, hipertermia moderada e desidratação (MULLER et al., 2010).

Os EAdV (HAdV40 e HAdV41) foram detectados em células intestinais, mas não em secreções nasofaríngeas, o que sugere que sejam restritos ao trato gastrintestinal (UHNNOO et al., 1984). Além destes, os HAdV da espécie A (sorotipos 12, 18 e 31) também apresentam tropismo pelo trato gastrintestinal, podendo causar DDA, embora não sejam, obrigatoriamente, entéricos. Entretanto, ocorre ainda, de alguns HAdV das espécies B e C serem, ocasionalmente, excretados nas fezes (FILHO et al., 2007; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009), embora esses vírus infectem, principalmente, o trato respiratório (BERK, 2007). Sendo assim a presença de HAdV nas fezes deve ser interpretada de forma cuidadosa, uma vez que esta não significa, necessariamente, que estejam associados à DDA.

Os EAdV infectam os enterócitos maduros da extremidade da vilosidade do intestino delgado. As lesões produzidas levam à atrofia das microvilosidades e repovoamento compensatório do epitélio, por células secretoras imaturas, causando hiperplasia das criptas, com conseqüente má absorção e perda de líquido (Figura 6). O mecanismo que induz à produção da diarreia não é bem entendido, embora pareça ser mediado pela diminuição da absorção de açúcares, pela incapacidade secretória das células da cripta, que substituem as células maduras, mortas, levando à perda de permeabilidade intestinal, devido à diminuição das dissacaridases. A destruição das células produtoras de dissacaridases e as conseqüentes alterações digestivas acentuam a carga osmótica do cólon, com concomitante eliminação de água (BEVIGLIERI, 1979; WILHELMI, ROMAN e SANCHEZ-FAUQUIER, 2003).

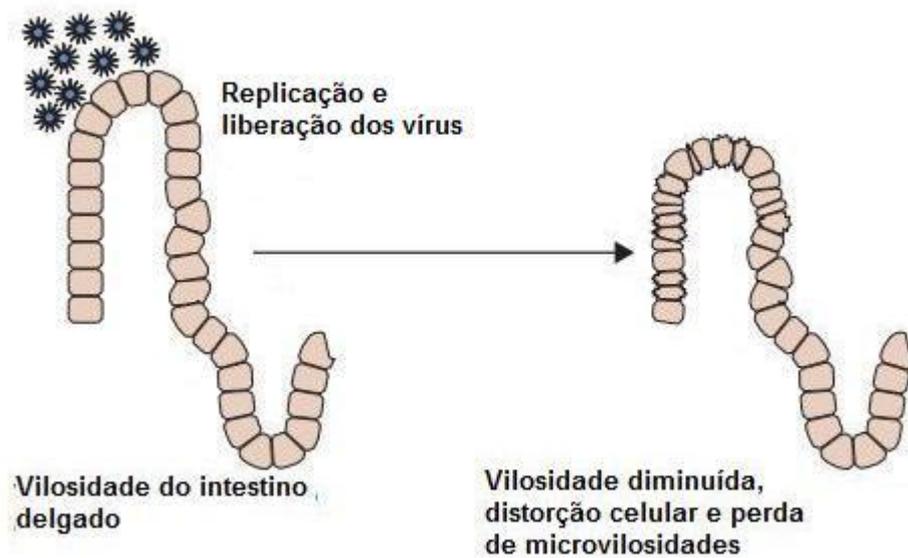


Figura 6: Ação dos adenovírus no intestino.  
Fonte: Adaptado de THAPAR e SANDERSON, 2004.

#### 2.1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial dos HAdV se estabeleceu, inicialmente, a partir da detecção das partículas virais, através da microscopia eletrônica, devido à dificuldade de cultivo nos sistemas celulares convencionais (BAUM, 2000). A microscopia eletrônica possibilita a identificação rápida e específica destes agentes virais em espécimes clínicos, devido à sua morfologia única, embora não permita a classificação em espécie e sorotipo (Figura 7) (FLOMENBERG, BABBIT e DROBYSKI, 1984).

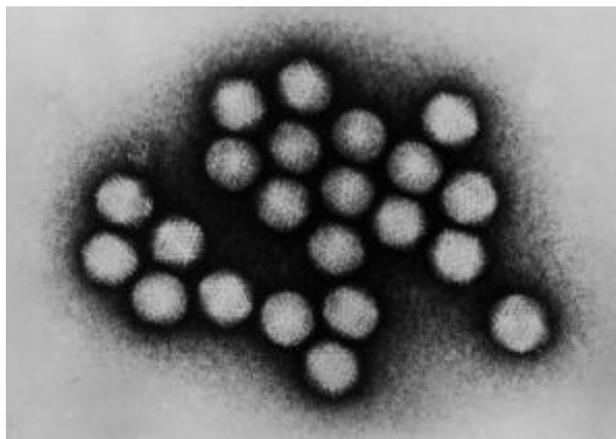


Figura 7: Microscopia eletrônica mostrando partículas de HAdV

Os sorotipos 40 e 41 são fastidiosos, logo, de difícil isolamento nas linhagens celulares normalmente utilizadas para a propagação dos HAdV. Entretanto, nas células Graham 293 ou HEK-293 (rim embrionário humano, transformado pelo HAdV 5), eles são replicados com sucesso, com visualização do efeito citopático, que consiste em arredondamento e agregação de células intumescidas (WOLD e HORWITZ, 2007). A identificação pode ser realizada, ainda, utilizando-se as técnicas de imunofluorescência (IF), ensaio imunoenzimático (EIE) e teste de neutralização (TN). Os teste de inibição da hemaglutinação (IH) e TN medem antígenos específicos e podem ser efetuados para identificação dos sorotipos.

O EIE é um método prático, sensível e específico para a detecção dos HAdV entéricos. Além de permitir estudos epidemiológicos em larga escala, possibilita a identificação do antígeno viral, diretamente das fezes (BENKO e HARRACH, 2003).

No Brasil, durante muitos anos, foi utilizado, nos laboratórios de referência para DDAs, um EIE combinado para RV e HAdV (EIERA), fabricado por Biomanguinhos, na FIOCRUZ-RJ. Este teste era muito sensível e específico para a detecção desses agentes, além da concordância dos resultados quando comparados com outras técnicas diagnósticas (PEREIRA et al., 1985). Entretanto,

sua produção foi descontinuada, a partir de 2004.

Outra técnica de detecção é o teste de aglutinação em látex, que depende do anticorpo específico para aglutinar em presença de proteínas do HAdV. Este método possui valor prático para os laboratórios de pequeno porte, mas é um método menos sensível, podendo gerar resultados positivos com HAdV não entéricos (GRADIEN, 1996; BENKO e HARRACH, 2003).

A partir do advento da biologia molecular, outras técnicas tem sido empregadas para a detecção do genoma viral e caracterização dos HAdV, como a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), análise do DNA viral por enzimas de restrição e sequenciamento.

Para a detecção de adenovírus, por PCR, são utilizados iniciadores específicos para amplificação de uma região do gene que codifica o hexon, a qual apresenta homologia entre os diferentes tipos de adenovírus. Assim é possível detectar adenovírus de diferentes espécies e sorotipos, inclusive os entéricos (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001). A visualização de bandas mais fortes na eletroforese em gel de agarose pode indicar maior quantidade de genoma viral presente nas amostras, sugerindo uma replicação viral no epitélio intestinal, ao passo que as bandas mais fracas podem ser resultado da disseminação viral a partir de outros tecidos infectados, sem que haja replicação no intestino. A genotipagem por seqüenciamento é necessária para se confirmar a espécie e o sorotipo do HAdV detectado. Portanto, a simples detecção do vírus a partir de amostras fecais, sem a identificação de espécie e do sorotipo, deve ser interpretada com cautela, uma vez que os adenovírus não entéricos podem ser excretados nas fezes, sem associação com a DDA (BERK, 2007).

### 2.1.5 EPIDEMIOLOGIA

Em todo o mundo ocorrem infecções por adenovírus, em humanos e em animais. Os adenovírus animais são patogênicos somente para as espécies de origem e poucos HAdV são, também, patogênicos para alguns animais (BERK, 2007).

Os HAdV-F (sorotipo 40 e 41) são de transmissão fecal-oral, principalmente através do contato pessoa a pessoa (GINSBERG et al., 1999). Uma grande quantidade de vírus é produzida e liberada pelos indivíduos infectados, em geral, excedendo  $10^9$  partículas, por grama de fezes (BÁNIAY et al., 2009).

Estes enteropatógenos já foram detectados em várias partes do mundo, tanto em casos esporádicos como em surtos de DDA, em locais como creches e escolas (VAN et al., 1992; AKIHARA et al., 2005). Estudos epidemiológicos demonstraram índices significativos da infecção por HAdV associados à DDA, confirmando a importância desses vírus como agentes etiológicos da doença (COLOMBA et al., 2006; DEY et al., 2011). A prevalência de infecção pelos EAdV é variável, tendo sido encontrados em levantamentos realizados em países industrializados, índices que variaram de 1% a 8%, e em países em desenvolvimento, índices que variaram de 2% a 31% (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003).

Embora os sorotipos 40 e 41 sejam responsáveis por 1 a 20 % dos casos de DDA, sorotipos das espécies A, B e C, também já foram relacionados à doença (VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; JOTHIKUMAR et al., 2005). Diferentes estudos, realizados entre os anos 2002 e 2011, mostraram que os HAdV40 e HAdV41 tem sua participação comprovada em casos de diarreia em vários países, de diferentes continentes, apresentando índices de detecção variados (AMINU et al., 2007; LENNON et al., 2007; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; BÁNYAI et al., 2009; CUNLIFFE et al., 2010; LORROT et al., 2011). Em diversos países foi

encontrada uma predominância do HAdV41 em relação ao HAdV40 (FUKUDA et al., 2006; LENNON et al., 2007; BÁNYAI et al., 2009; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; DEY et al., 2011), entretanto no Brasil, duas pesquisas envolvendo tipagem mostraram uma prevalência dos HAdV40 (SOARES et al., 2002 ; FILHO et al.,2007) .

Embora pouco realizados no Brasil, levantamentos epidemiológicos sobre os EAdV tem mostrado um envolvimento importante desses patógenos, os quais são responsáveis por uma parcela considerável de casos brandos e graves de DDA. Pesquisas realizadas em diferentes cidades comprovaram a circulação desses agentes nas diferentes regiões geográficas brasileiras, mostrando a prevalência da infecção e/ou a definição da espécie e do sorotipo do HAdV detectado.

Em São Paulo, Hársi e colaboradores (1995) reportaram 10% (7/67) de amostras fecais positivas para HAdV, em estudo realizado com crianças hospitalizadas com DDA, sendo que os HAdV 40/41 foram os sorotipos mais encontrados.

Outro trabalho, realizado com crianças com DDA, hospitalizadas e não hospitalizadas, no Rio de Janeiro e em Salvador, entre 1996 e 2003, analisou um total de 3060 amostras fecais, das quais 61 (2%) foram positivas para adenovírus. Dentre as amostras positivas que puderam ser tipadas, observou-se que 65% (35/57) pertenciam à espécie F, tendo sido encontrados, também, HAdV das espécies A, C e D, bem como casos de co-infecção das espécies F/A, F/C, F/D e B/D (FILHO et al., 2007).

Um outro estudo envolvendo amostras de casos esporádicos de DDA nas cidades do Rio de Janeiro, Niterói, Juiz de Fora e Londrina, realizado no período de 1999 a 2000, reportou que os HAdV foram detectados em 4,9% (69/1420) das amostras fecais analisadas. Destes, 32% (22/69) pertenciam à espécie F (SOARES et al., 2002).

Em Juiz de Fora, Minas Gerais, BARLETTA e colaboradores (2009) realizaram um levantamento epidemiológico de patógenos virais associados à gastroenterite infantil, no período 2005-2006, tendo reportado uma positividade de 5,38% (17/316) para HAdV, utilizando o kit EI ERA. Nesta mesma cidade, ROQUE (2010) detectou HAdV utilizando EI ERA e PCR em 6,03% (14/232) de amostras diarréicas infantis, obtidas de casos esporádicos da doença.

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, os HAdV foram detectados em 3,6% (15/145) das amostras fecais de crianças hospitalizadas por gastroenterite (ANDREASI et al., 2008). Também na região centro-oeste, um estudo epidemiológico realizado entre os anos 1989 e 2003, mostrou que entre as 39 amostras de HAdV detectadas, a mais prevalente foi a espécie F (76,9%), seguida da espécie C (15,4%) e da espécie A (5,1%) (FREITAS et al., 2010).

Em São Luis, Maranhão, uma pesquisa realizada entre junho de 1997 e julho de 1999, com amostras fecais obtidas de crianças menores de 2 anos, hospitalizadas, mostrou uma prevalência de 6,5% (8/123) de HAdV entéricos, nas amostras analisadas (FERREIRA et al., 2004).

Na Amazônia brasileira, a investigação da presença de vírus entéricos numa população infantil, realizada entre os anos 2000 e 2002, mostrou que os HAdV estavam presentes em 6,4% (30/470) das amostras fecais de crianças hospitalizadas por DDA, em Porto Velho (MAGALHÃES et al., 2007). Em Belém, Pará, os HAdV foram detectados em 6,3% (24/380) das amostras fecais analisadas, sendo que os sorotipos 40 e 41 perfizeram 58,3% (14/24) das amostras positivas (MULLER et al., 2010).

Além dos levantamentos epidemiológicos de HAdV em espécimes clínicas, esses vírus também tem sido pesquisados em amostras de água ambiental. As altas taxas de detecção encontradas, apontam que este vírus pode ser considerado um indicador potencial de patógenos virais entéricos humanos no ambiente (PINA et al., 1998; BOFFIL-MAS et al., 2006).

No Brasil, pesquisas recentes envolvendo a análise de águas demonstraram a expressiva presença de HAdV neste ambiente. Na cidade de Limeira, SP, foi constatada a presença destes agentes em todas as 50 amostras de efluentes domésticos analisados, sendo que os HAdV da espécie F foram identificados em 82% das mesmas (BARELLA et al., 2009). RIGOTTO e colaboradores (2010) detectaram esses vírus em 64,2% das amostras analisadas, em Florianópolis, SC (RIGOTTO et al., 2010).

Em relação à ocorrência da infecção pelos HAdV entéricos, diversos trabalhos realizados no mundo, inclusive no Brasil, sugeriram que esta não apresenta perfil de sazonalidade (HERRMANN et al., 1988; BÁNYAI et al., 2009; FUKUDA et al., 2006, ANDREASI et al., 2008., BARLETTA et al., 2009), embora tenha sido observada uma tendência para ocorrência desta infecção na estação seca, em pesquisa realizada na Nigéria (AMINU et al., 2007).

No que diz respeito à faixa etária, de uma maneira geral, tem sido observado que as infecções por HAdV entéricos ocorrem, principalmente, em crianças de até 24 meses de idade, entre os indivíduos imunocompetentes (HERRMANN et al., 1988; FERREIRA et al., 2004; FILHO et al., 2007; BARLETTA et al., 2009; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; MULLER et al., 2010; DEY et al., 2011). No entanto, em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a DDA é uma complicação freqüente em qualquer idade. Entre adultos HIV positivos, a diarreia crônica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade e entre as crianças imunodeprimidas, a prevalência da diarreia, duração, gravidade e mortalidade são maiores, quando comparadas com as crianças imunocompetentes (KOSEK, BERN e GUERRAND, 2003).

Alguns autores apontaram que, em indivíduos imunodeficientes, os HAdV foram o segundo vírus mais frequentemente associado à DDA e que nestes os sorotipos 50 e 51 foram relacionados aos quadros de diarreia (DE JONG et al., 1999; THOMAZ, POLLOK E GAZARD., 1999; TREVINO, PRIETO E PEÑALVER., 2001).

No Brasil, estudos desenvolvidos em São Paulo e no Rio de Janeiro, envolvendo pacientes HIV positivos com diarreia, mostraram uma prevalência de HAdV de 7,5% (10/133) e 7,7% (2/26) dos casos analisados, respectivamente (MORILLO et al., 2010.; SILVA et al., 2010.)

### **2.1.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA**

Para as infecções entéricas por HAdV, o tratamento utilizado é o mesmo que o recomendado para os casos de DDA viral, para os quais a terapia recomendada é a reidratação oral, podendo-se aplicar nos casos mais graves, a reidratação intravenosa.

Desde 1970, a TRO tem sido utilizada para prevenir a desidratação associada à diarreia. A solução feita a partir de sais de reidratação oral (SRO) é o “padrão ouro” da TRO e deve ser utilizada, tão logo os episódios de diarreia se iniciem. Uma nova fórmula, conhecida como SRO de baixa osmolaridade (menor concentração de sódio e glicose) foi desenvolvida e tem apresentado resultados melhores que o da versão de SRO original, pois provoca menos vômitos e fezes e diminui a necessidade de infusões intravenosas (GUIA PRÁTICO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Esta terapia tem como objetivo a reposição de eletrólitos perdidos em decorrência de vômito e diarreia. Contudo, medidas preventivas como boas condições sanitárias e de higiene pessoal são as melhores maneiras para a redução do número de casos (WILHELMI, ROMAN e SANCHEZ-FAUQUIER, 2003). Melhor acesso à água potável, saneamento adequado e boa higiene pessoal são fundamentais para a prevenção da diarreia. A lavagem das mãos com água e sabão é uma medida muito importante para se evitar a transmissão da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Para crianças com diarreia persistente, a Organização Mundial de Saúde

(OMS) recomenda a suplementação com sulfato de zinco, o qual reduz a duração e os episódios de diarreia (GUIA PRÁTICO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2008).

O estado nutricional da criança é um fator que influencia a gravidade da doença, pois crianças mal nutridas tendem a ter diarreia mais prolongada, com episódios mais freqüentes, que conseqüentemente podem agravar ainda mais o seu estado nutricional e comprometer seu desenvolvimento (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). As crianças que são adequadamente alimentadas com o leite materno desenvolvem menos infecções graves nos dois primeiros meses de vida, correndo menos risco de morte por doenças infecciosas, como a diarreia. O leite materno contém nutrientes e anticorpos necessários para que a criança cresça e se desenvolva. Além disso, é útil para a reposição de líquidos e deve continuar sendo oferecido mesmo durante a diarreia, simultaneamente com a solução de reidratação oral (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

### **2.1.6 RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

A DDA afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, destacando-se como a segunda maior causa de morte entre crianças menores de cinco anos, atrás apenas da pneumonia (BOSCHI-PINTO, VELEBIT e SHIBUYA, 2008; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A OMS estima uma ocorrência anual de 2,5 bilhões de casos da doença, responsáveis por 1,5 milhão de mortes anuais, ultrapassando o número de mortes provocadas pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), malária e sarampo, juntos (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Deve se considerar, ainda, que muitos casos da doença não são contabilizados, seja pela ocorrência de formas brandas de DDA, em que os pacientes não procuram por atendimento médico, seja pela falta de atendimento, devido à sobrecarga na rede pública de saúde e/ou pela inexistência ou subutilização dos poucos testes diagnósticos disponíveis para a maioria dos agentes virais causadores da doença (VICTORA et al., 2000). Assim sendo, vários casos de DDA ficam sem definição etiológica. Dentre os agentes virais envolvidos na etiologia da doença, os RV podem ser rapidamente identificados em laboratórios de análises clínicas, já que para estes existem kits de detecção, comercialmente disponíveis. A análise da participação dos demais vírus entéricos é restrita aos laboratórios de pesquisa, devido aos altos custos dos testes e demanda de tempo para realização das reações, o que os tornam comercialmente inviáveis para a utilização em laboratórios de análises clínicas. No que diz respeito aos HAdV, pouco se sabe sobre a circulação dos mesmos em Minas Gerais. Assim, a realização de estudos epidemiológicos se faz necessária, para verificar a presença e a circulação desses vírus, bem como caracterizar, genotipicamente, as amostras detectadas, a fim de se conhecer os tipos de HAdV circulantes em nosso meio e gerar dados epidemiológicos, que poderão contribuir para um maior conhecimento sobre esta virose em Minas Gerais e no Brasil e para o desenvolvimento de possíveis estratégias futuras de controle e prevenção desta doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar um estudo epidemiológico sobre os HAdV associados à DDA, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2010.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar a presença de HAdV nos espécimes fecais obtidos de pacientes apresentando DDA .

- Determinar a prevalência da infecção por HAdV ao longo do período estudado.

- Avaliar se houve associação entre a procedência das espécimes fecais (hospitalar/ ambulatorial ) e a ocorrência da infecção por HAdV

- Avaliar se houve influência de fatores demográficos, como gênero e idade do indivíduo, na ocorrência da infecção pelos HAdV.

- Avaliar, pela curva de detecção dos casos positivos, se houve influência de fatores climáticos na ocorrência da infecção, bem como a existência de um perfil de

sazonalidade para a mesma.

- Verificar a ocorrência de coinfeção de HAdV com outros vírus entéricos, como RV, NoV e Astrovírus (HAstV), detectados em outras pesquisas paralelas do laboratório.

- Fazer a caracterização molecular das amostras de HAdV detectadas, para a determinação da espécie e dos sorotipos das mesmas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 ÁREA ESTUDADA**

Este trabalho foi realizado em Juiz de Fora, cidade situada na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, região Sudeste do país. Segundo dados oficiais, a maior parte da população (98,9%) de aproximadamente 518.000 habitantes tem acesso à água potável, sendo que 97,7% do esgoto recebe tratamento, antes de ser dispensado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

Com altitude variando entre 463m a 1.104m, a cidade apresenta clima tropical de altitude , que se caracteriza por apresentar dois períodos bem definidos: o da estação úmida que vai dos meses de outubro a abril, com temperaturas mais elevadas e maiores índices de precipitação pluviométrica; a da estação seca, que abrange os meses de maio a setembro, período de temperaturas mais baixas e menores índices pluviométricos (SECRETARIA DE POLÍTICA URBANA DA PJJ/LABORATÓRIO DE CLIMATOLOGIA GEOGRÁFICA E ANÁLISE AMBIENTAL /UFJF/2010).

#### **4.1.2 ESPÉCIMES FECALIS**

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEPH-UFJF), sob os pareceres de nº 049/2007 e nº 058/2010 (anexo A).

As amostras fecais foram coletadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis dos menores, não tendo sido possível determinar se foram oriundas ou não de surtos epidêmicos. Estas foram enviadas, em ambiente refrigerado, ao Laboratório de Virologia do DMPI/ICB-UFJF, onde receberam codificação e foram registradas de acordo com a data da coleta, idade, gênero do indivíduo e procedência (hospitalar/ ambulatorial). Todas as amostras foram estocadas sob refrigeração (-20 °C), até o momento de sua análise.

Este estudo transversal, realizado no Laboratório de Virologia do DPMI/ICB-UFJF, contou com 395 espécimes fecais, a maioria proveniente de pacientes com até 60 meses de idade, com sintomas de diarreia aguda, atendidas em serviços de saúde da rede pública e privada do município de Juiz de Fora, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2010. Das 395 amostras, 339 foram de origem ambulatorial e 56 de hospitalar. Quanto ao gênero, 175 amostras pertenciam a indivíduos do sexo masculino, 176 ao sexo feminino e em 44 amostras não foi possível determiná-lo. Todas as amostras foram anteriormente testadas para a presença de RV, NoV, HAsTV.

#### **4.1.3 DADOS CLIMATOLÓGICOS**

Os dados climatológicos, como as médias de temperatura e pluviosidade mensais, referentes ao período de estudo, foram obtidos no Laboratório de

Climatologia Geográfica e Análise Ambiental da UFJF (LCAA-UFJF).

#### 4.1.4 AMOSTRAS CONTROLE

Para a padronização da técnica de PCR e controle positivo dos experimentos realizados, foi utilizada uma amostra de HAdV C sorotipo 5, geneticamente caracterizada no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da FIOCRUZ-RJ, gentilmente cedida pelo Dr. José Paulo Gagliardi Leite. Como controle negativo foi utilizada água livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®) .

#### 4.1.5 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DEGENERADOS

Para realizar a detecção dos HAdV foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores degenerados, para uma região de aproximadamente 301pb do gene que codifica o hexon, cujas sequências podem ser encontradas no quadro 3 .

Quadro 3- Características dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR para detecção de HAdV.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')	Posição no genoma	Produto (pb)
Hex 1	GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT	21-45	301
Hex 2	CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA	302-322	

Fonte: ALLARD, ALBINSSON e WADELL (2001) S=C/G, R=A/G, K=G/T, W=A/T, I=Inosina

## **4. 2 MÉTODOS**

A composição e o modo de preparo das soluções utilizadas durante os experimentos encontram-se disponíveis no apêndice A.

### **4.2.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS**

Suspensões fecais 10%-20%, preparadas em tampão Tris-Ca<sup>++</sup> HCl 0,01M, pH 7,2, foram homogeneizadas e a seguir clarificadas (5.000 RPM por 10 minutos, a 4°C). O sobrenadante clarificado foi estocado a -20°C, até a sua utilização.

### **4.2.2 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL**

Neste estudo, foi utilizada a técnica de extração do genoma viral, de acordo com a metodologia descrita por Boom et al. (1990), como brevemente relatada a seguir:

Em um microtubo estéril foram adicionados 1000µL de tampão L6, 400µL do sobrenadante clarificado acima e 20µL de uma suspensão de sílica a 12%. Após homogeneização por 10 segundos, o microtubo foi colocado em plataforma de agitação lenta, por 30 minutos e nova centrifugação a 14000RPM por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N e ao precipitado foram adicionados 1000µL de tampão L2. Após homogeneização por 10 segundos, foi realizada outra centrifugação a 14000RPM por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado em solução de

NaOH 10N. A seguir foram adicionados ao precipitado, 1000 µL de etanol 70%, gelado (4°C), seguindo-se uma homogeneização por 10 segundos e centrifugação a 14000RPM por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e, em seguida, adicionado ao precipitado, 1000µL de acetona PA, gelada (4°C). Após homogeneização por 10 segundos, a suspensão foi centrifugada a 14000RPM por 1 minuto e o sobrenadante novamente descartado. O microtubo foi levado ao banho-maria, à temperatura de 56°C por 15 minutos, com a tampa aberta, para a evaporação dos resíduos de acetona. A seguir, foram adicionados 60µL de água livre de Rnase/Dnase (Invitrogen®) e após homogeneização por 10 segundos, obteve-se uma suspensão. O microtubo foi novamente incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos, com a tampa fechada e após este período, foi realizada outra centrifugação a 14000RPM por 1 minuto. Cerca de 45 µL do sobrenadante, contendo o ácido nucléico viral extraído, foi coletados e transferido para microtubo limpo e estéril, estocado a -20 °C ou mantido a 4 °C, quando usado no mesmo dia.

#### **4.2.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO ADENOVÍRUS**

Para a detecção de adenovírus pela PCR, foi utilizado o protocolo descrito por Allard, Albinsson e Wadell (2001), como descrito a seguir.

Em um microtubo de 200µL foram adicionados 5µL do DNA e 20µL da mistura de reagentes (quadro 4), para um volume final de 25µL. Essa mistura foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/20 segundos), hibridização (56°C/20 segundos), extensão (72°C/30 segundos) e um ciclo de extensão final (72°C/7 minutos). Os produtos amplificados foram armazenados a 4°C, até o momento da análise.

Quadro 4: Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume/Reação</b>
H <sub>2</sub> O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®)	-	32,2µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	10X	5,0µL
dntp: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen®)	2,5µM	4,0µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	50 mM	1,50µL
Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores Hex1-Hex2	25µM	2µL (1 µL de cada)

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (100 volts por 1 hora) em gel de agarose a 1,5%, incorporado com solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml (Sigma Chemical Company®), utilizando-se cuba horizontal (HMEDI10-BUV, Biosystems®) com tampão TBE 0,5M 1X, pH 8,4. Foram aplicados em cada poço, 10µL do produto da reação, somados a 2µL do corante “blue orange loading dye” (Invitrogen®). Como referência para o tamanho dos produtos foi utilizado um padrão de tamanho de DNA de 100pb (Promega®). Após a corrida, os produtos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (GE HEALTH CARE, United Kingdon) e o registro feito em sistema de captura de imagem (IMAGE QUANT 100- GE HEALTH CARE, United Kingdon), para posterior análise.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fragmentos amplificados de, aproximadamente, 301pares de bases.

#### **4.2.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE DO HEXON PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE E DO SOROTIPO DOS ADENOVÍRUS**

Como a reação de PCR não permite identificar os HAdV detectados, é necessário submeter os produtos amplificados (DNA) das amostras positivas à reação de sequenciamento, para a determinação da espécie e sorotipo dos vírus. Esta definição é importante, uma vez que o fato de estar presente nas fezes não significa, necessariamente, que o HAdV detectado esteja associado à DDA, como já explicado anteriormente.

Assim, os produtos amplificados das amostras de HAdV positivos (DNA) foram submetidos à reação de purificação, utilizando-se o kit comercial “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN® , Valencia, CA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Após a purificação, os “amplicons” foram quantificados em gel de agarose a 2%, utilizando-se um padrão de massa “Low DNA Mass Ladder”(Invitrogen®). Os produtos de PCR purificados e quantificados foram usados como molde para a reação de sequenciamento parcial do gene do Hexon, segundo a metodologia descrita por Allard, Albinsson e Wadell (2001), utilizado-se o kit comercial “Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit “ (Applied Biosystems®, CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante. Os produtos foram sequenciados em sequenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.2.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As sequências parciais obtidas foram editadas e alinhadas, utilizando-se o programa “BioEdit Sequence Alignment Editor ” (HALL, 1999). Para a análise filogenética das sequências foi utilizado o programa MEGA 5 versão 5.05 (TAMURA et al., 2007). A distância genética foi calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros, utilizando-se o método *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 réplicas. As sequências obtidas foram comparadas com as seqüências de diferentes amostras protótipo de HAdV e outras sequências provenientes de diferentes países do mundo, depositadas no portal GenBank.

#### 4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 13.0. A associação da ocorrência da infecção com o gênero e a idade dos pacientes , bem como com a procedência das amostras foi verificada, utilizando-se o Teste Qui-Quadrado, estabelecendo-se um valor de  $p < 0,05$ , como valor de significância estatística.

## 5 RESULTADOS

Neste estudo, foram analisadas 395 amostras fecais diarréicas, não tendo sido possível determinar se as mesmas foram provenientes de casos esporádicos ou de surtos da doença. Os resultados obtidos que respondem aos objetivos propostos estão apresentados a seguir.

A distribuição anual das amostras testadas e positivas para HAdV, no período 2007-2010, pode ser observada na tabela 1 e na figura 8.

Tabela 1: Detecção de HAdV, em Juiz de Fora, no período 2007-2010

Ano	Amostras	
	Testadas	Positivas ADV
2007	96	6
2008	148	11
2009	94	16
2010	57	10
Total	395	43

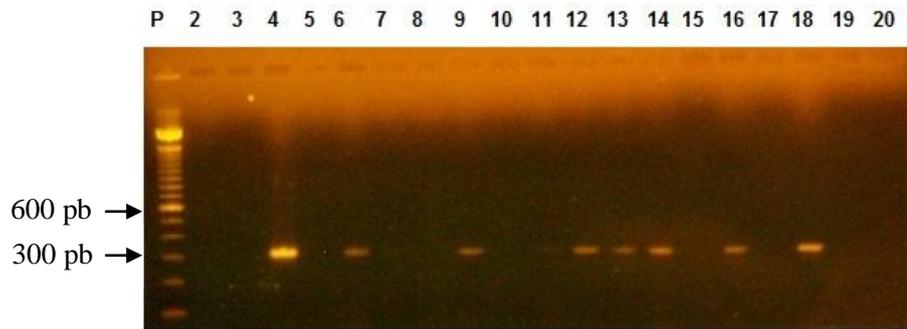


Figura 8: Gel de agarose para detecção de HAdV.

(P) Padrão de tamanho de DNA (100 pb); (4) controle positivo; (5) controle negativo; (6,9,12,13,14,16,18) amostras positivas (301pb); (7,8,10,11,15,17,19,20) amostras negativas. O fragmento amplificado de aproximadamente 301pb é característico dos HAdV, quando são utilizados os iniciadores Hex1 e Hex2.

Os resultados obtidos mostraram que das 395 amostras fecais testadas, foram detectadas 43 amostras positivas para HAdV .

A distribuição mensal e anual das amostras fecais testadas e positivas, bem como as taxas de ocorrência da infecção por HAdV, podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição mensal e anual das amostras testadas e positivas e a prevalência anual das infecções para HAdV , em Juiz de Fora, no período 2007-2010

Mês	2007		2008		2009		2010		Total	
	Positivo /total	%	Positivo /total	%	Positivo /total	%	Positivo /total	%	Positivo /total	%
Jan	0/3	0	0/7	0	3/10	30	0/10	0	<b>3/30</b>	10
Fev	0/2	0	0/5	0	1/11	9.1	0/2	0	<b>1/20</b>	5
Mar	0/22	0	1/7	14.3	0/7	0	0/6	0	<b>1/42</b>	2.4
Abr	4/20	20	1/11	7.7	1/10	10	0/1	0	<b>6/44</b>	13.6
Mai	1/12	8.3	0/13	0	1/8	12.5	0/2	0	<b>2/35</b>	5.7
Jun	0/10	0	0/18	0	1/3	33.3	2/8	25	<b>3/39</b>	7.7
Jul	0/5	0	0/13	0	2/7	28.6	0/1	0	<b>2/26</b>	7.7
Ago	0/6	0	1/33	3.2	1/6	16.7	4/9	44.4	<b>6/52</b>	11.5
Set	0/5	0	1/9	11.1	3/11	27.3	3/11	27.3	<b>7/36</b>	19.4
Out	0/3	0	1/13	7.7	2/11	18.2	1/3	33.3	<b>4/30</b>	13.3
Nov	0/6	0	2/8	25	½	50	0/3	0	<b>3/19</b>	15.8
Dez	½	50	4/11	36.4	0/8	0	0/1	0	<b>5/22</b>	22.7
Total	6/96		11/148		16/94		10/57		43/395	
%	6.25		7.4		17.0		17.5		10.9	

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que nos anos 2007 e 2008, as taxas de prevalência foram de 6,25% e 7,4 %, respectivamente. Entretanto, a análise dos anos de 2009 e 2010, mostrou que houve um aumento na prevalência da infecção, quando as taxas de detecção alcançaram índices de 17% e 17,5%, respectivamente.

A distribuição das amostras testadas e positivas para HAdV , segundo a procedência das mesmas, pode ser observada na tabela 3.

Tabela 3: Procedência das amostras testadas para adenovírus, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. ( $p=0,152$ )

Ano	Origem						Total
	Ambulatorial			Hospitalar			
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	
2007	6	78	84	0	12	12	96
2008	9	120	129	2	17	19	148
2009	16	66	82	0	12	12	94
2010	9	35	44	1	12	13	57
Total	40	299	339	3	53	56	395

Os resultados revelaram que 93% (40/43) das amostras positivas foram detectadas em pacientes atendidos em ambulatório, enquanto apenas 7% (3/43) foram detectadas em pacientes hospitalizados. No entanto, o cálculo do qui-quadrado mostrou um valor de  $p=0,152$ .

Na figura 9, pode-se verificar a distribuição das amostras positivas para HAdV, de acordo com o gênero do indivíduo.

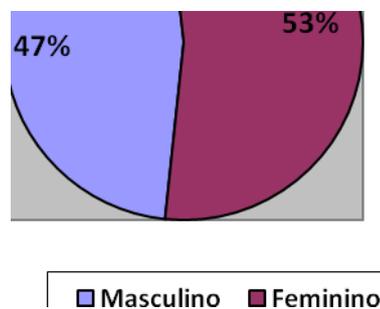


Figura 9: Distribuição por gênero de amostras positivas, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. ( $p=0,393$ ).

A distribuição das amostras positivas, de acordo com o gênero, mostrou que 47% (20/43) foram detectadas em indivíduos do sexo masculino e 53% (23/43) em indivíduos do sexo feminino. A análise estatística apontou um valor de  $p=0,393$ .

A distribuição das amostras testadas e positivas, por faixa etária, pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição das amostras positivas, por faixa etária, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Idade	2007		2008		2009		2010		Total	
	Pos /total	%	Pos /total	%	Pos /total	%	Pos /total	%	Pos /total	%
0-12	3/25	12	8/50	15	5/21	23	5/10	50	<b>21/106</b>	17,9
13-24	1/26	3,8	1/42	2,4	9/41	22	1/8	1,2	<b>12/117</b>	10,9
25-36	2/14	14	1/15	6,7	0/8	-	1/3	33	<b>4/40</b>	12,5
37-48	0/5	-	1/10	10	0/1	-	0/2	-	<b>1/18</b>	5,5
49-60	0/10	-	0/9	-	0/2	-	0/5	-	<b>0/26</b>	-
>60	0/15	-	0/21	-	2/20	10	3/24	11	<b>5/80</b>	6,1
Total	6/95 <sup>1</sup>		11/147 <sup>1</sup>		16/93 <sup>1</sup>		10/52 <sup>2</sup>		43/387	

<sup>1</sup>: em uma amostra não foi possível obter informação sobre a idade, em cada um dos anos 2007, 2008 e 2009.

<sup>2</sup>: em cinco amostras não foi possível obter informação sobre a idade, no ano 2010.

A maioria das amostras obtidas pertencia à faixa etária de 0 a 24 meses, sendo que, em todos os anos deste estudo foram detectadas amostras positivas para HAdV nesta mesma faixa, o que nem sempre foi observado com as amostras fecais oriundas de crianças maiores de 24 meses.

A figura 10 mostra o percentual acumulado, por faixa etária, das amostras positivas para HAdV.

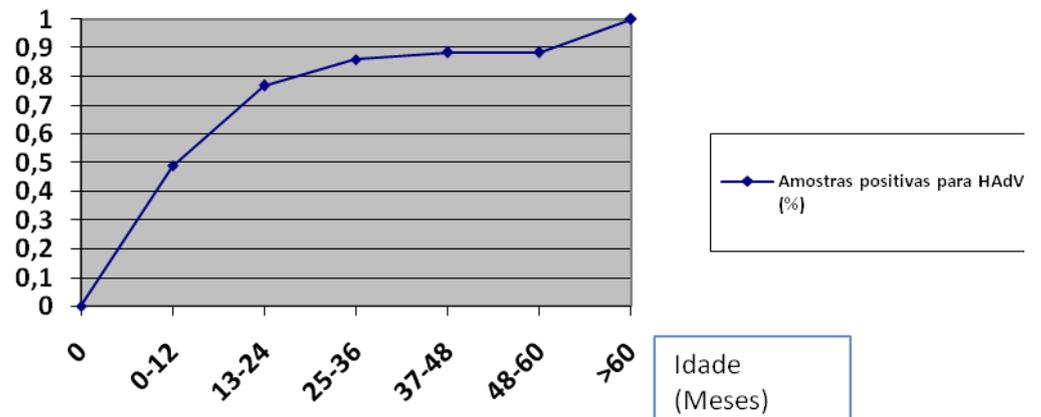
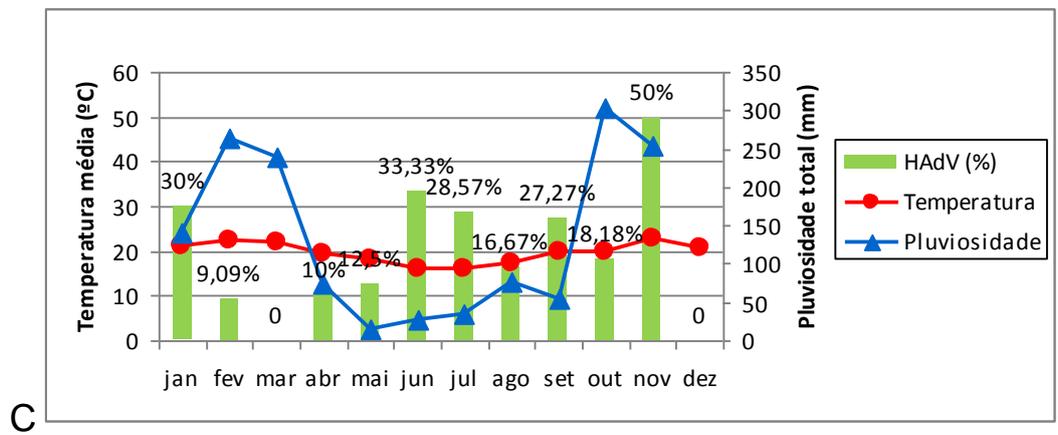
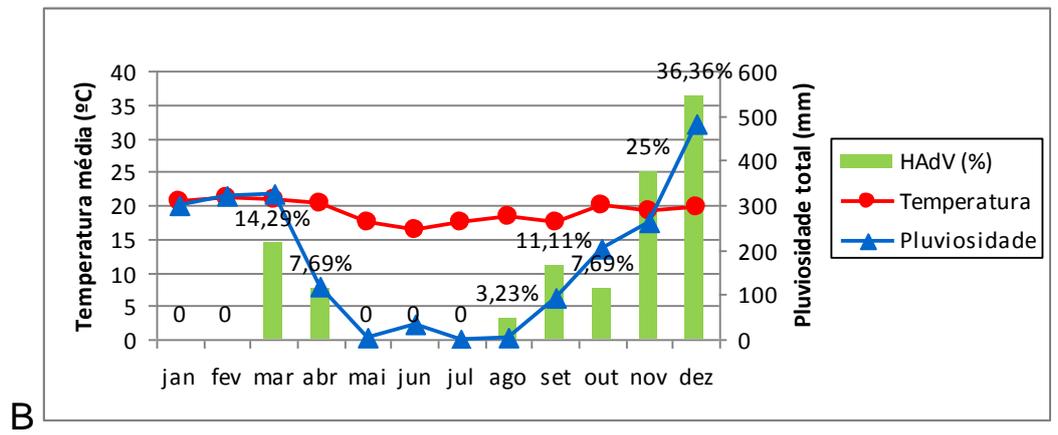
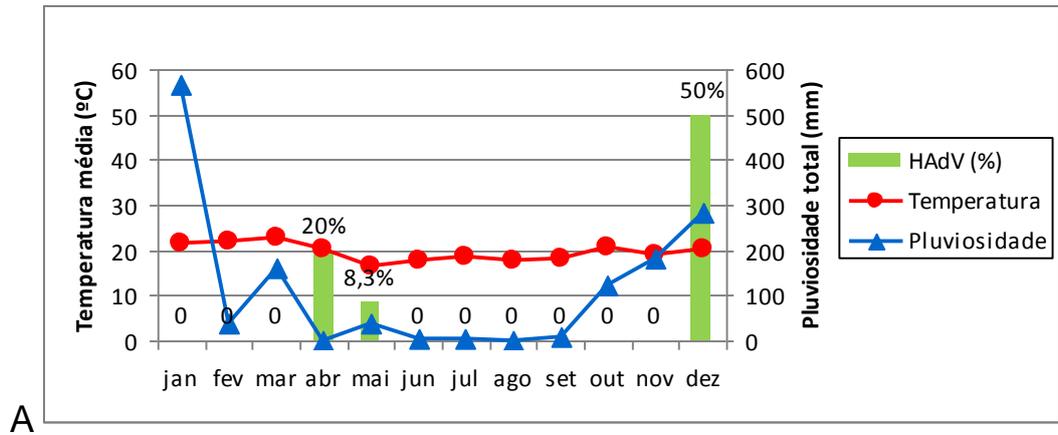


Figura 10: Percentual acumulado das amostras positivas para HAdV em relação à faixa etária, no período 2007-2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Foi possível observar que 76,7% das amostras positivas detectadas pertenciam a crianças na faixa de 0 a 24 meses. A análise estatística da associação entre ocorrência da infecção e faixa etária mostrou um valor de  $p=0,007$ .

Na figura 11 pode se observar a ocorrência dos casos positivos relacionados com os valores médios de temperatura e pluviosidade, nos quatro anos de estudo.



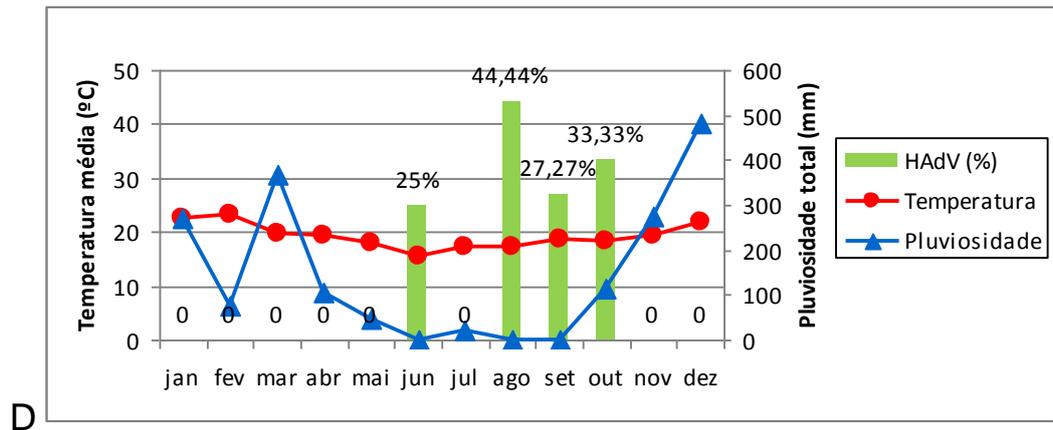


Figura 11:: Distribuição mensal das amostras positivas para HAdV e valores médios de temperatura e precipitação no município de Juiz de Fora em 2007(A), 2008 (B), 2009 (C) e 2010 (D).

De uma maneira geral, os HAdV foram detectados ao longo dos meses do ano, sem correspondência consistente com os índices de temperatura e pluviosidade. No ano de 2007, foram detectadas amostras positivas nos meses de abril, maio e dezembro. Em 2008, as infecções por HAdV foram detectadas nos meses de março, abril e de agosto a dezembro. Em 2009, houve grandes variações nas médias de pluviosidade e ocorreram casos positivos de infecções por HAdV em, praticamente, todos os meses do ano. Em 2010, os casos positivos foram detectados somente em meses onde foram registrados baixos índices pluviométricos, como junho, agosto, setembro e outubro.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de coinfeção, foram cruzados os dados de detecção de HAdV, obtidos nesse estudo, com dados de detecção de RV, NoV e HAstV, obtidos em outros estudos realizado, paralelamente, no Laboratório de Virologia da UFJF (Tabela 5).

Tabela 5: Coinfecção de HAdV com NoV, RV, HAstV, por ano.

	HAdV	AdV-NoV	AdV-RV	AdV-HAstV
2007	5	-	1	-
2008	10	-	1	-
2009	12	3	2	-
2010	9	-	1	-
Total	36	2	5	-

A análise das 43 amostras positivas, mostrou que em 36 delas o HAdV foi o único agente detectado, dentre os vírus pesquisados. Foi observada coinfecção com RV (5/43) e com NoV (2/43), não tendo sido detectada coinfecção com HAstV.

Para realizar a caracterização molecular das amostras de HAdV, visando definir a espécie e o sorotipo das mesmas, as 43 amostras positivas foram submetidas à reação seqüenciamento. Das seqüências obtidas, apenas 35 puderam ser utilizadas na análise filogenética. As oito amostras que não apresentaram qualidade satisfatória e geraram resultados inconclusivos serão, posteriormente, ressubmetidas ao seqüenciamento para caracterização.

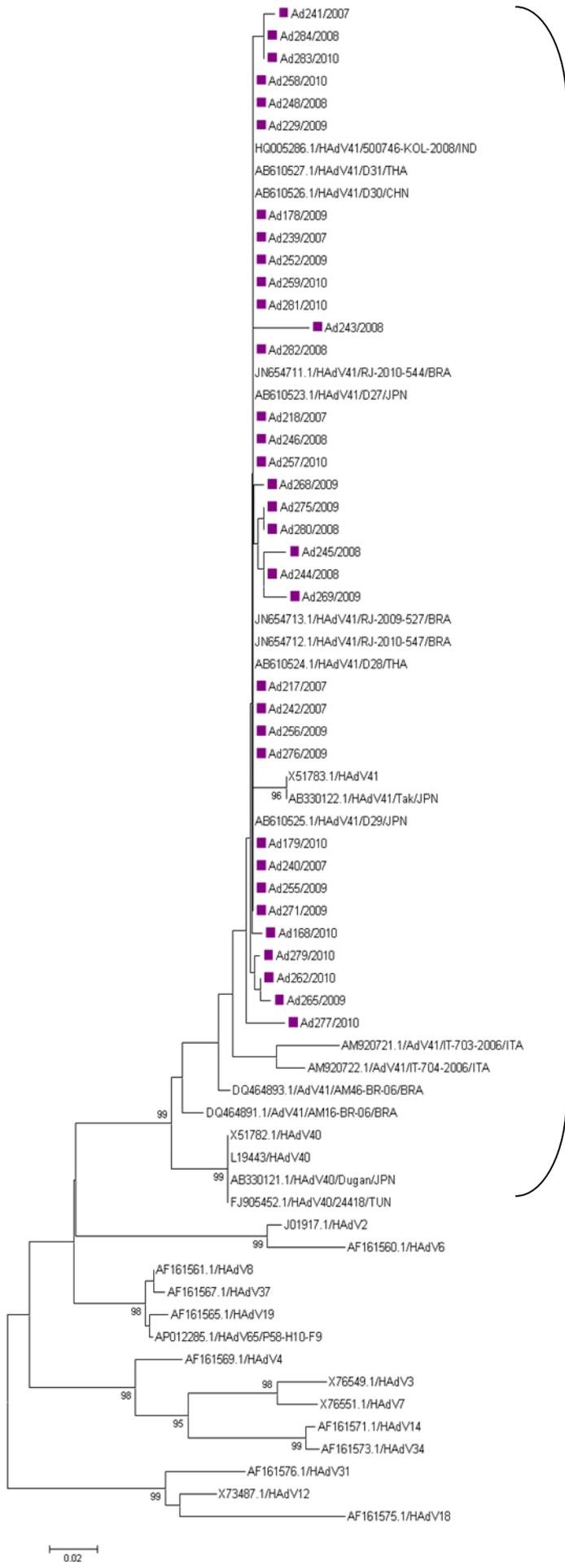
A análise filogenética das 35 seqüências parciais que apresentaram boa qualidade mostrou que estas foram agrupadas com a amostra protótipo X51783 e outras do Brasil e de outras partes do mundo, depositadas no GenBank, todas pertencentes à espécie F, sorotipo 41. Portanto, este resultado permite indicar que as amostras detectadas em Juiz de Fora devem pertencer ao sorotipo 41, da espécie F (Figuras 12 e 13).



F

0.02

Figura 12: Árvore filogenética, baseada na sequência de nucleotídeos do gene do hexon, de amostras de HadV isoladas de crianças de Juiz de Fora, Minas Gerais, entre 2007 e 2010. O programa MEGA , versão 5.05 foi utilizado, empregando-se o método “Neighbor-Joining” e o modelo “Kimura 2-parameter”. Para a construção dessa árvore foram utilizadas as sequencias obtidas neste estudo, sequencias de outras amostras do Brasil e do mundo, além dos protótipos, obtidos no Portal Entrez Pudmed GenBank. As designações indicam o número da amostra /genótipo/nome da amostra/ país da infecção. Os protótipos usados foram: X51782 (HAdV40), X51783 (HadV 41).



F

0.02

Figura 13: Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos o gene do hexon de amostras de HadV isoladas de crianças de Juiz de Fora, Minas Gerais, entre 2007 e 2010. O programa MEGA , versão 5.05 foi utilizado, empregando-se o método “Neighbor-Joining” e o modelo “Kimura 2-parameter”, com Bootstrap de 1000 réplicas. Para a construção dessa árvore foram utilizadas as sequencias obtidas neste estudo, sequencias de outras amostras do Brasil e do mundo, além dos protótipos, obtidos no Portal Entrez Pudmed GenBank. As designações indicam o número da amostra /genótipo/nome da amostra/ país da infecção. Apenas os valores de bootstrap acima de 80 foram colocados nessa árvore. Os protótipos usados foram: X51782 (HAdV40), X51783 (HadV 41).

## 6 DISCUSSÃO

A DDA é uma das doenças mais comuns em humanos, constituindo uma das principais causas de morbi-mortalidade nos países em desenvolvimento, devido à sua associação com os problemas higiênico–sanitários, má nutrição e atendimento precário nos sistemas públicos de saúde. Assim, em países da África, Ásia e América Latina esta doença constitui a segunda causa mais comum de mortalidade infantil, sendo responsável por 1 a 3 milhões de óbitos em crianças menores de 5 anos, por ano (BLACK et al., 2010). Mesmo nos países desenvolvidos há registros de altos índices de morbidade associada à doença, a qual pode comprometer o desenvolvimento infantil, além de gerar custos diretos e indiretos à sociedade (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004).

Entre 1980 e 2000, houve uma redução notável (98,6%) nas taxas de mortalidade infantil por diarreia. No Brasil, esses dados se confirmaram, visto que esta doença foi responsável por 17,3% dos óbitos infantis, no período 1985-1987, e no período 2003-2005, a taxa de óbitos caiu para 4,2%. Diversos fatores contribuíram para o declínio da mortalidade infantil por DDA, no Brasil. Na década de 1980, foram realizadas intensas campanhas para adoção de reidratação oral, com a participação do Ministério da Saúde, da Sociedade Brasileira de Pediatria, da Pastoral da Criança, do UNICEF e da Organização Pan-Americana de Saúde. Durante esse período, houve grandes avanços referentes às melhorias nas condições de saneamento e tratamento de água, além de terem sido criados o Sistema Único de Saúde (SUS) e o Programa de Saúde da Família (VICTORA, 2009). Embora tenha havido essa redução nessa taxa de óbitos, muito ainda precisa ser feito. Segundo dados DATASUS, a DDA foi responsável por 2,5% das mortes ocorridas em crianças abaixo dos 5 anos, em 2009, no Brasil, sendo que em Roraima, essa taxa foi de 7,7%. Além disso, deve-se ressaltar o fato que essas taxas podem não expressar exatamente a realidade, uma vez que a DDA não é uma doença de notificação compulsória nacional, em se tratando de casos isolados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No que diz respeito à etiologia viral da DDA, trabalhos realizados em várias partes do mundo já comprovaram que os adenovírus entéricos são agentes etiológicos responsáveis por vários casos da doença (AMINU et al., 2007; LENNON et al., 2007; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; BÁNYAI et AL., 2009) e de fato, estes vírus já foram considerados por alguns autores como o segundo agente viral, mais associado à DDA (UHNOO et al., 1984; KIDD et al., 1986 ). Entretanto, no Brasil, os levantamentos epidemiológicos sobre essa virose ainda são bem restritos e pouco é conhecido, particularmente em Minas Gerais, onde a pesquisa de HAdV nos espécimes fecais de indivíduos hospitalizados e atendidos em ambulatórios, visando estudar sua circulação, aspectos demográficos e climatológicos, bem como a caracterização molecular ainda não tinha sido realizada até o momento.

É importante esclarecer que os espécimes fecais analisados foram obtidos por conveniência, ou seja, sem busca ativa. Portanto, a prevalência de 10,9% encontrada neste estudo, pode não refletir a situação real, uma vez que apenas uma ínfima percentagem dos casos ocorridos na cidade, foi analisado. Mesmo levando este fato em consideração, a prevalência encontrada foi similar àquelas relatadas, anteriormente, em outros trabalhos realizados no Brasil, cujos índices de positividade variaram de 3,6% a 10% dos casos analisados (HÁRSI et al., 1995; SOARES et al., 2002; FERREIRA et al., 2004; MAGALHÃES et al.,2007; ANDREASI et al., 2008; BARLETTA et al., 2009 ; MULLER et al., 2010;ROQUE et al., 2010 ).

Analisando-se separadamente os anos de estudo, observou-se que as prevalências dos anos 2007 e 2008 apresentaram valores próximos, mas com um aumento considerável na detecção de HAdV em 2009, a qual se manteve semelhante em 2010. Levando-se em consideração que as amostras foram obtidas em todo o período do estudo sem busca ativa, pode-se inferir que nos anos 2009 e 2010 houve um aumento na circulação destes vírus em Juiz de Fora.

Segundo a literatura, a infecção entérica pelos HAdV causa geralmente doença branda ou moderada (MULLER et al.,2010), o que requereria, na maioria

das vezes, apenas atendimento ambulatorial. Sendo assim, houve interesse em verificar a possível influência da origem da amostra (ambulatorial ou hospitalar) sobre a ocorrência da infecção. Entretanto, a análise desse dado não mostrou correlação estatisticamente significativa entre a ocorrência da infecção e a origem da amostra.

Em relação à influência do gênero do indivíduo acometido sobre a ocorrência da infecção pelos HAdV, a análise dos resultados mostrou que não houve relação com significância estatística entre estes fatores, fato observado anteriormente por Andreasi et al( 2008), mas diferente do relatado por Jarecki-khan, Tzipori e Unicomb( 1993), que encontrou maior positividade para HAdV entre crianças do sexo masculino.

A ocorrência da infecção, quando relacionada a idade dos infectados, mostrou que a maioria das amostras positivas para HAdV foram detectados em crianças de 0 a 2 anos, confirmando trabalhos realizados, anteriormente, no Brasil e no mundo, segundo os quais, a maioria dos casos foi encontrada nessa faixa etária (HERRMANN et al., 1988; FERREIRA et al., 2004; FILHO et al., 2007; BARLETTA et al., 2009; VERMA, CHITAMBAR e VARANASI, 2009; MULLER et al., 2010; DEY et al., 2011). A análise destes dados mostrou que houve relação com significância estatística entre idade e ocorrência da infecção. Entretanto, vale salientar que, de uma maneira geral, a procura por atendimento clínico, em casos de DDA, é feita principalmente pelos responsáveis por crianças mais novas, uma vez que estas são mais susceptíveis a complicações mais sérias. Casos brandos e moderados de DDA em crianças maiores e adultos, geralmente, não requerem atendimento clínico, seja ambulatorial ou hospitalar.

Neste trabalho, não se observou uma clara associação entre a ocorrência da infecção pelos HAdV entéricos, sua distribuição mensal e os índices de temperatura e pluviosidade, assim como foi verificado em diversos trabalhos já realizados, que sugeriram ausência de sazonalidade das infecções por estes vírus (HERRMANN et al., 1988; FUKUDA et al., 2006, ANDREASI et al., 2008., BÁNYAI et al., 2009; BARLETTA et al., 2009), entretanto, uma pesquisa realizada na Nigéria apontou uma tendência para ocorrência desta infecção na estação seca, neste país (AMINU

et al., 2007).

No que diz respeito à ocorrência de coinfeção de HAdV com outros vírus entéricos, os resultados obtidos com o cruzamento dos dados de detecção de RV, NoV e HAsTV, mostrou que na maioria das amostras positivas para HAdV, este foi o único agente viral detectado, dentre os pesquisados, confirmando sua importante participação na gênese da DDA. Este resultado é semelhante ao relatado num trabalho realizado na Tunísia, no qual os HAdV foram detectados como agentes únicos na maioria dos casos desta infecção (77,7%), com poucos casos de coinfeção com RV e NoV (SDIRI-LOULIZI et al., 2009). Numa outra pesquisa realizada na França, os HAdV foram os únicos agentes virais detectados em casos de DDA (LORROT et al., 2011).

A caracterização molecular dos adenovírus é imprescindível para a determinação da espécie e do sorotipo da amostra. Assim, a análise das sequências parciais das 35 amostras de HAdV detectadas em Juiz de Fora revelou que todas foram classificadas na espécie F, à qual pertencem os adenovírus entéricos, confirmando assim, que os HAdV detectados foram, de fato, os responsáveis pelos quadros de DDA ocorridos. Os HAdV da espécie F, que são os estritamente entéricos, compreendem os sorotipos 40 e 41. Nesse trabalho, todos os HAdV da espécie F detectados são do sorotipo 41. A predominância de HAdV 41 já tinha sido, anteriormente, apontada em alguns trabalhos (FUKUDA et al., 2006; BANYAI et al.; 2009; SDIRI-LOULIZI et al., 2010), entretanto, em pesquisas realizadas por alguns autores brasileiros (SOARES et al., 2002; FILHO et al., 2007), foi observada a predominância de HAdV40.

Os resultados obtidos permitiram comprovar a presença e circulação dos adenovírus entéricos, mostrando sua importante participação como causa de DDA infantil, em Juiz de Fora. Estes resultados produziram dados epidemiológicos mais consistentes sobre os adenovírus entéricos no estado e contribuíram para aumentar o conhecimento sobre esta virose no Brasil. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de possíveis estratégias de controle e prevenção desta infecção, pelas autoridades de saúde.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu constatar a presença e a circulação dos adenovirus entéricos na população da cidade de Juiz de Fora, no período 2007-2010, confirmando a sua importante participação como agente etiológico da DDA.

As análises dos dados obtidos mostraram que houve correlação com significancia estatística entre a idade do indivíduo e a ocorrência da infecção, o mesmo não tendo sido observado com relação à procedência da amostra a ao gênero do indivíduo infectado.

Não foi possível observar perfil de sazonalidade das infecções por HAdV nem uma relação de sua ocorrência com as variações de temperatura e pluviosidade, no período estudado.

Na maioria dos casos de DDA, positivos para HAdV, este foi o único agente viral detectado, entre os virus pesquisados, embora tenham sido observados casos de coinfeção com RV e NoV.

A análise filogenética das sequências parciais do gene do Hexon das amostras de HAdV detectadas em Juiz de Fora permitiu inferir que elas devem pertencer à espécie F, sorotipo 41.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, A.; GIRONES, R.; JUTO, P.; WADELL, G. 1990. Polymerase chain reaction for detection of adenovirus in stools samples. **Journal of Clinical Microbiology**:28(12), 2659-2667.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. 2001. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**: 39(2), 498-505.

ALBINSSON, B.; KIDD, A. H. 1999. Adenovirus type 41 lacks an RGD av-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. **Virus Research**:64, 125-136.

AMINU, M.; AHMAD, A.A.; UMOH, J.U.; BEER, M.C.; ESONA, M.A.; STEELE, A.D. 2007. Adenovirus Infection in Children with Diarrhea Disease in Northwestern Nigeria. **Annals of African Medicine**:6(4),168-173.

ANDERSON, C. W.; YOUNG, M. E.; FLINT, S. J. ,1989. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. **Virology**, 172: 506-512.

ANDREASI, M.S.A .; CARDOSO, D. D. P.; FERNANDES, S.M.; TOZETI, I. A.; BORGES, A. M. T.; FIACCADORI, F. S.; SANTOS, R. A.T.; SOUZA, M. 2008. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(7): 741- 747.

ARNBERG, N.; PRING-ARKERBLOM, P.; WADELL, G. 2002. Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a cellular Receptor on Chang C Cells. **Journal of Virology**, 8834-8841.

AKIHARA, S.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; HANSMAN, G.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. 2005. Existence of multiple outbreaks in viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. **Archives of Virology**, 150: 2061-2075.

BÁNYAI, K.; KISFALI, P.; BOGDÁN, Á.; MARTELLA, V .; MELEGH, B.; ERDMAN, D.; SZUCS, G. 2009. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**,28: 997-999.

BARELLA, K. M.; GARRAFA, P.; MONEZI, T. A . ; HÁRSI, C. M.; SALVI, C.; VIOLANTE, P. A.B.C.; MEHNER, D. U. 2009. Longitudinal Study On Occurrence Of Adenoviruses And Hepatitis A Virus In Raw Domestic Sewage in The City Of Limeira , São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, **40**: 102-107.

BARLETTA, V. H.; LIMA, R.A.; FERREIRA, A.S.; BARLETTA, R. A.; REIS, T.A.V.; ROQUE, A.R.; TIBIRIÇÁ, S.H.; CARVALHO, I. P.; ROSA E SILVA, M.L. 2009. Investigação de patógenos virais associados   gastroenterite infantil aguda. **PRINCIPIA**: 01/09.

BAUM, S.G. 2000. Adenovirus. In GL Mandell, JE Bennet, R Dolin. **Principles and Praticce of Infectious Diseases**, 1624-1630.

BENKO, M; HARRACH, B. Molecular evolution of adenoviruses. 2003. **Current Topic Microbiology Immunobiology**, **272**: 3-35.

BERK, A. J. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. 2007. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippicott Willians & Wilkins, p. 2355-2394.

BEVIGLIERI, J. C. 1979. Rotavírus humanos: Morfologia e Patogenia. **Pediatria São Paulo**. 314-318.

BLACK, R. E; COUSENS, S; JOHNSON, H. L; LAWN, J. E; RUDAN, I; BASSANI, D. G; JHA, P; CAMPBELL, H; WALKER, C. F; CIBULSKIS, R; EISELE, T; LIU, L; MATHERS, C. Child health epidemiology reference group of who and unicef. 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, **375**: 1969–87.

BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GORONES, R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and poliomavirus JCPyV in wasterwater matrices. **Applied and environmental Microbiology**, **72**: 7894-7896.

BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PME and VAN DER NOORDAA J.1990. Rapid and Simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, **28(3)**:495-503.

BOSCHI-PINTO C, VELEBIT L, SHIBUYA K.2008. **Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries**. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:< [http:// www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054/en/print.html](http://www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054/en/print.html)>. Acesso em março de 2011.

CHEN, P.H.; ORNELLES, D.A.; SHENK, T. 1993. The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 e disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. **Journal Virology**, **67**: 3507-3514.

COLOMBA, C.; DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; SAPORITO, L.; SCARLATA, F.; TITONE, L.; ARISTA, S. 2006. Viral gastroenteritis in children hospitalized in Sicily, Italy. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, **25 (9)**: 570-575.

COYNE, C. B.; BERGELSON, J. M. 2005. CAR: A virus receptor within the tight junction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **57**: 869-882 .

CUNLIFFE, N.A.; BOOTH, J.A.; ELLIOT, C.; LOWE, S.J.; SOPWITH, W.; KITCHIN, N.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; HART, C.A.; REGAN, M. 2010. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, united kingdom. **Emerging infectious diseases**: **16**.

CUSACK, S. 2005 Adenovirus complex structures. **Current Opinion in Structural Biology**,**15**:237-243.

DE JONG, J. C.; WERMEMBOL, A.G.; VERWEIJ-UIJTERWAAL, M.W.; SLARTERUS, K.W.; DILEN, P. W.; DOORNUM, G.J.J.; KHOO, S.; HIERHOLZER, J.C. 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively.1999. **Journal of Clinical Microbiology**,**37**: 3940-3945.

DEY, R.S.; GHOSH, S.; CHAWLA- SARKAR, M.;PANCHALINGAM, S.;NATARO, J.P.; SUR, D.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T. 2011.circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata,India. **Journal of clinical microbiology**, **49**: 500-505.

FAVIER, A.; SCHOEHN, G.; JAQUINOD, M.; HARSI, C.; CHROBOCZEK, J. 2002. Structural Studies os Human Enteric Adenovirus Type 41. **Virology**, **293**: 75-85.

FERREIRA, L.M.; MORAIS, M.A.A.; COSTA, I.V.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LUZ, C.R.M. 2004. Detection of adenovirus type 40/41 in hospitalized children from São Luís, Maranhão. In: 15<sup>th</sup> National Meeting of Virology; Sep 26-29. 67-68. **Virus Reviews & Research**:**9**, Suppl 1 ).

FILHO, E.P.; FARIA, N.R.C.; FIALHO, A.M .; ASSIS, R.S.; ALMEIDA, M.M.S.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; SANTOS, F.B.; BARRETO, M.L.; LEITE, J.P.G . 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. **Journal of Medical Microbiology** , **56**: 313-319.

FLOMENBERG,P; BABBIT, J; DROBYSKI, W. R. 1984.Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. **Journal Infectious Disease**, **169**: 775-781.

FREITAS, E.R.L.; BORGES, A.M.T.; FIACCADORI, F.S.; SOUZA, M.B.L.D.; CARDOSO, D.D.P. 2010. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. **Archives of Virology**,**155**(10): 1693-1696.

FUKUDA, S.; KUWAYAMA, M.; TAKAO, S.; SHIMAZU, Y.; MIYAZAKI, K. 2006. Molecular Epidemiology Of Subgenus F Adenoviruses Associated With Pediatric Gastroenteritis During Eight Years In Hiroshima Prefecture As A Limited Area. **Archives Of Virology** , **151**: 2511-2517.

GINSBERG, H. S. 1999. The life and thimes of adenovirus. **Advances in Virus Research**,**54**: 1-13.

GRADIEN, M. 1996. Viral diagnosis by antigen detection techniques. **VIROLOGY**, **5**: 81-90.

GREBER, U.F., WILLETTS, M., WEBSTER, P., HELENIUS, A.1993.Stepwise Dismantling of Adenovirus 2 during Entry into Cells. **Cell**, **75**: 477-486.

GREEN, N.M., WRIGLEY, N.G., RUSSEL, W.C., MARTIN, S.R., AND MCLACHLAN,

A.D.1983. Evidence for a repeating cross-B sheet structure in the adenovirus fibre. **The Embo Journal**, **2**: 1357-1365.

GUIA PRÁTICA DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA: DIARRÉIA AGUDA. 2008. WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **WGO Practice Guidelines**.

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

HARSI, C.M.; ROLIM, D.P.; STEWIEN, K. E.; CANDEIAS, J. A. N.; GOMES, S.A.; GILIO, A. E.; BALDACCI, E. R. 1995. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **Journal Medical Virology**, **45(2)**:127-34.

HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. B.; PERRON-HENRY, D. M.; CLEMENTS, E.; TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P. 1988. Incidence of Enteric Adenoviruses among Children in Thailand and The Significance of these Viruses in Gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, **26(9)**: 1783-1786.

HOSOKAWA, K.; SUNG, M. T. 1976. Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5. **Journal of Virology**, **17**: 924-934.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC". 2004. Diarréia e rotavírus. **Revista de Saúde Pública**, **38(6)**:884-885.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/censo2010/>. Acesso em: 16 maio de 2011.

JARECKI-KHAN, K.; TZIPORI, R.S.; UNICOMB, L. 1993. Enteric Adenovirus Infection Among Infants With Diarrhea in Rural Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**: 484-489.

JONES II, M.S.; HARRACH, B.; GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.A.; CRUZ, W.P.; RIEDEL, R.; PAN, C.; DELWART, E.L; SCHNURR, D.O. 2007. New Adenovirus Species Found In A Patient Presenting With Gastroenteritis. **Journal Of Virology**, **81**: 5978-5984.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L.; HILL, V. R.; LU, X.; SOBSEY, M. D.; ERDMAN, D.D. 2005. Quantitative Real-Time Pcr Assay For Detection Of Human Adenoviruses And Identification Of Serotypes 40 And 41. **Applied And Environmental Microbiology**, **71(6)**: 3131-3136.

KIDD, A.H.; ROSENBLAT, A.; BESSELER, T.G.; ERASMUS, M.J.; TIEMESSEN, C.T.; BERKOWITZ, F.E.; SCOURB, B.D. 1986. Characterization of rotaviruses and subgroup f adenoviruses from acute summer gastroenteritis in South Africa. **Journal Of Medical Virology**, **18**:159-168.

KIDD AH, CHROBOCZEK J, CUSACK S, RUIGROK RW.1993. Adenovirus type 40 virions contains two distinct fibers. **Virology** ,**192**: 73-84.

LENNON, G.; CASHMAN, O .; LANE, K .; CRYAN, B .; O'SHEA, H. 2007. Prevalence and Characterization of Enteric Adenoviruses in the South of Ireland. **Journal of Medical Virology**, **79**:1518-1526.

LORROT, M.; BOM, F.; EL HAJJE, M.J.; AHO, S.; WOLFER, M.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; MARC, E.; RAYMOND, J.; LEBON, P.; POTHIER, P.; GENDREL, D. 2011. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, **30**: 361-368.

MAGALHÃES, G. F.; NOGUEIRA, P. A .; GRAVA, A . F.; PENATI , M.; SILVA, L. H. P. S.; ORLANDI, P. P. 2007. Rotavirus and Adenovirus in Rondônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **5(102)**: 555-557.

MEDGHALCHI S., PADMANABHAN R., KETNER G. 1997. Early Region Adenovirus DNA Replication by two Genetically Separable Mechanisms. **Virology**, **236**: 8-17.

MEDINA-KAUWE, L.K. 2003. Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsids proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **55**: 1485-1496.

MEIER, O., GREBER, U. F. 2004. Adenovirus endocytosis. **The journal of gene medicine**, **6**: 152-163.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011. Dença Diarréica Aguda. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1549](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549) . Acesso em 20 de junho de 2011.

MIYAZAWA N.,CRYSTAL R.G., LEOPOLD P.L. 2001. Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. **Journal of Virology**, **75**: 1387-400.

MORILLO, S.G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; CARMONA, R.C.C.; NEME, S.N.; TIMENETSKY. 2010. Rotavirus genotype G4P[8] and enteric adenovirus in HIV-positive patients with and without diarrhea in São Paulo State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,**104**: 165-167.

MULLER, E.C.A.; MORAIS, M. A.A.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. 2010. Detection of adenoviruses in children with severe acute gastroenterites in the City of Belém, Pará State, Brazil. **Rev Pan-Americana Saude**, **1(3)**: 49-55.

NWANEGBO, E. et al. 2004 . Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**,**11**: 351-357.

PARASHAR UD, BRESEE JS, GENTSCH JR, GLASS RI.1998. Rotavirus. **Emerging Infectious Diseases**,**4(4)**:561-570.

PEREIRA, H.G; AZEREDO, R.S; LEITE, J.P.G; ANDRADE, Z.P; CASTRO, L. 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **Journal Virology Methods**,**10**: 21-28.

PIENIAZEK D, PIENIAZEK NJ, MACEJAK D, LUFTING RB. 1990. Enteric adenoviruses type 41 (tak) contains a second fiber protein gene. **Nucleic Acids Research**, **18 (7)**:1901.

PINA, S.; PUIG,M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. 1998. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**: 3376-3382.

REKOSH, D. M. et al. 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. **Cell**, **11**: 283-295.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO,V.; KOLESNIKOVAS, C. K.;CORRÊA, A. A.; SOUZA, D.S.M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SIMÕES,C. M. O.; BARARDI,C.R.M. 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotaviruspresence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**,**09**: 1979–1987

ROCHA, M.C.G.S. 2010. **Diarreia aguda em crianças hospitalizadas no município de Juiz de Fora – Minas Gerais: Prevalência e fatores de risco associados à gravidade da doença.** Dissertação Acadêmica (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de Concentração em Saúde Brasileira) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

ROELVINK, P. W.; LIZONOVA, A.; LEE, J. G. M.; LI, Y.; BERGELSON, J. M.; FINBERG, R. W.; BROUGH, D.E.; KOVESDI, I.; WICKHAM, T. 1998. The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D E, and F. **Journal of Virology**, **72** : 7909-7915.

ROQUE, A, K. 2010. **DETECÇÃO DE ASTROVÍRUS E ADENOVÍRUS ASSOCIADOS A CASOS DE GASTROENTERITE INFANTIL AGUDA NO PERÍODO DE 2007 A 2008, NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS.** Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora .Juiz de Fora, Minas Gerais.

RUSSELL, W. C.; LAVER, W. G.; SANDERSON, P. J.1968. Internal components of adenovirus. **Nature**, **219**: 1127-1130.

RUSSELL, W. C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. **Journal of General Virology**, **81**: 2573-2604.

RUX, J.J., BURNETT, R.M .2004. Adenovirus Structure. **Human Gene Therapy**, **15**:1167-1176.

SAN MARTIN, C.; BURNETT, R. M. 2003. Structural studies on adenoviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**,**272**: 57-94.

SANTOS, N.M.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D.2008. **Introdução à VIROLOGIA HUMANA.** 2º EDIÇÃO. GUANABARA KOOGAN.

SDIRI-LOULIZI, K.; GHARBI-KHELIFI, H.; ROUGEMONT, A.; HASSINE, M.; CHOUCANE, S.; SAKLY, N.; POTHIER, P.; GUÉDICHE, M.N.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. 2009. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus and

Adenovirus Serotypes 40/41 Strains Related to Acute Diarrhea in Tunisian Children. **Journal of Medical Virology**, **81**:1895-1902.

SECRETARIA DE POLÍTICA URBANA DA PJF/ LABORATÓRIO DE CLIMATOLOGIA GEOGRÁFICA E ANÁLISE AMBIENTAL (LabCA-ICH /UFJF) . 2009. Estação Climatológica Principal de Juiz de Fora. Centro de Pesquisas Sociais. Banco de Dados Departamento de Geociências, UFJF.

SHORT, J.J.; PEREBOEV , A, V.; KAWAKAMI, Y.; VASU, CHENTHAMARAKSHAN.; HOLTERMAN , M, J.; CURIEL, D. T. 2004. Adenoviruses serotype 3 utilizes CD80(B71) and CD86 (B72) as cellular attachment receptors. **Virology**, **322**:349-359.

SIGNAS, C., AKUSJARVI, G., AND PETERSSON, U. 1985. Adenovirus 3 fiber polypeptide gene: Implications for the structure of the fiber protein. **Journal of Virology**, **53**: 672-678.

SILVA, R.C.; BENATI, F.J.; PENA, G.P.A.; SANTOS, N. 2010. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in hiv-positive patients. **Brazil Infectious Diseases**, **14 (6)**: 549-552.

SIRENA, D.; LILIENFELD, B.; EISENHUT , M.; KALIN, S.; BOUCKE, K.; BEERLI, R.R.; VOGT, L.; RUEDL, C.; BACHMANN, M.F. 2004. The Human Cofactor CD46 Is a Receptor for Species B Adenovirus Serotype 3. **Journal of Virology**,**78(9)**: 4454-4462.

SIQUEIRA-SILVA, J. 2008. **Interaction studies of human adenovirus serotype 41 (HAdV-41) with permissive cells** [PhD thesis]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.,. KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** , **24**: 1596-1599.

THAPAR, N; SANDERSON, I.R.2004. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, **363**:641:53.

THOMAZ, P.D.; POLLOK, R.C.G.; GAZZARD, B.G. 1999. Enteric viral infections as a cause of diarrhoea in the acquired immunodeficiency . **HIV MEDICINE**, **1**:19-24.

TREVINO, M.; PRIETO, E.; PEÑALVER, D et al. 2001. Diarrea por adenovirus y astrovirus em pacientes inmunodeficientes hospitalizados. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, **19**: 7-10.

TOLLEFSON, A.E.; SCARIA, A.; HERMINSTON, T.W.; LICHTENSTEIN, D.L; et al.1996 .The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. **Journal Virology**,**70**:2296-2306

UHNOO, I; WADELL, G; SVENSSON, L; JOHANSSON, M. E. 1984.Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of clinical microbiology**, **20(3)**: 365-372.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598415\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598415_eng.pdf)>. Acesso em: 15 de março de 2011.

VAN, R.; WUN, C.C.; ORYAN, M.L.; MATSON, D.O.; JACKSON, L.; PICKERING, L.K. 1992. Outbreak Of Human Enteric Adenovirus, Types 40 And 41 In Houston Day Care Centers. **Journal pediatrics**, **120**: 516-521.

VAYDA, M. E.; FLINT, S. J. 1987.Isolation and characterization of adenovirus core nucleoprotein subunits. **Journal of Virology**, **61**: 3335-3339.

VELLINGA, J.; VAN DER HEIJDT, S.; HOEBEN, R.C. 2005. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. **Journal of General Virology**, **86**: 1581-1588.

VERMA, H.; CHITAMBAR, D.S.; VARANASI, G. 2009. Identification and Characterization of Enteric Adenoviruses in Infants and Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis. **Journal of Medical Virology** ,**81**:60-64.

VICTORA CG, BRYCE J, FONTAINE O, MONASCH R.2000. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, **78(10)**: 1246-1255.

VICTORA CG. 2009. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Journal of Pediatrics**, **85(1)**:3-5.

WALTERS, R.W.; FREIMUTH, P.; MONINGER, T.O., et al. 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. **Cell**, **110**:789-799.

WEBER, J. 2003 Adenain, the adenovirus endoprotease. **Acta Microbiologica Immunologica Hungarica** , **50**: 95:101.

WILHELMI, I; ROMAN, E; SANCHEZ-FAUQUIER, A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology Infectious**, **9**: 247-262.

WOLD, W. S M.; HORWITZ, M.S. Adenoviruses. KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. 2007.**Fields Virology**. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins.2395-2436.

## APÊNDICE A - COMPOSIÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES

### 1 SOLUÇÃO UTILIZADA NA CLARIFICAÇÃO DE AMOSTRAS FECAIS

#### 1.1 SOLUÇÃO 0,01M TRIS /HCL /CA<sup>++</sup>(0,0015M) PH 7,2

##### 1.1.1 Composição

Tris Base.....	0,65 g
Cloreto de cálcio.....	0,11 g
Água destilada (quantidade suficiente para- q.s.p).....	500 mL
Ácido clorídrico q.s.p.....	para ajustar o pH em 7,2

##### 1.1.2 Preparo

- 1) Separe todo o material e proceda a pesagem.
- 2) Em um béquer, coloque o tris e o cloreto de cálcio pesados e a seguir adicione um pouco da água destilada para dissolver os reagentes. Não coloque toda a água de uma vez, pois ocorre expansão de volume pela própria reação.
- 3) Ajuste o pH em 7,2 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro. A seguir ajuste o volume final com a água destilada, utilizando uma proveta.

### 2 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

#### 2.1 SUSPENÇÃO DE SÍLICA

##### 2.1.1 Composição

Sílica.....	60 g
Água deionizada q.s.p.....	500 mL

### 2.1.2 Preparo

- 1) Pesar 60 g de sílica em um béquer, completar para 500mL com água deionizada, utilizando uma proveta, homogeneizar e deixar sedimentar por 24 h.
- 2) Após este tempo, retirar 430 mL do sobrenadante por aspiração e dispensar. Ressuspender a sílica para 500ml com água deionizada, utilizando uma proveta, homogeneizar e deixar sedimentar por mais 5 h.
- 3) A seguir, retirar 440 mL do sobrenadante por aspiração e desprezar. Adicionar 600 µL de ácido clorídrico puro e verificar o pH da suspensão, que deve ficar em 2.
- 4) Colocar um agitador magnético dentro do béquer para manter a suspensão de sílica em constante homogeneização e pipetar alíquotas de 5mL para frascos âmbar ou para microtubos de 1,5 mL envolvidos com papel alumínio.
- 5) Autoclavar por 20 min/121°C e estocar na geladeira.

## 2.2 TAMPÃO DE L6

### 2.2.1 Composição

Isotiocianato de guanidina.....	120 g
Tris-HCl 0,1 M pH 6,4.....	100 mL
EDTA 0,2 M pH 8,0.....	22 mL
Triton X-100.....	2,6 g

Ocorre uma expansão do volume, de modo que o volume final é de 200mL.

### 2.2.2 Preparo

- 1) Pesar o Triton X-100 e o Isotiocianato de guanidina e colocar em um béquer.
- 2) Medir o EDTA e o Tris -HCl e adicionar ao béquer.
- 3) Colocar um agitador magnético e deixar dissolver.
- 4) Armazenar em frascos estéreis.

## 2.3 TAMPÃO DE L2

### 2.3.1 Composição

Isotiocianato de guanidina.....	120 g
---------------------------------	-------

Tris-HCl 0,1 M pH 6,4..... 100 mL

Ocorre uma expansão do volume, de modo que o volume final é de 200mL.

### 2.3.2 Preparo

- 1) Pesar o Isotiocianato de guanidina e colocar em um béquer.
- 2) Medir o Tris -HCl e adicionar ao béquer.
- 3) Colocar um agitador magnético e deixar dissolver.
- 4) Armazenar em frascos estéreis.

## 2.4 SOLUÇÃO DE TRIS-HCL 0,1M pH 6,4 (utilizada nos tampões L6 e L2)

### 2.4.1 Composição

Tris Base.....	1,41 g
Água destilada (quantidade suficiente para (q.s.p)).....	100 mL
Ácido clorídrico q.s.p.....	para ajustar o pH em 6,4

### 2.4.2 Preparo

- 1) Pesar o tris e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar um pouco da água destilada para dissolver o reagente.
- 3) Ajuste o pH em 6,4 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro.
- 4) Ajustar o volume em 100 mL, utilizando uma proveta.

## 2.5 SOLUÇÃO DE EDTA 0,2 M pH 8,0 (utilizada no preparo do tampão L6)

### 2.5.1 Composição

EDTA.....	3,72 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
Ácido clorídrico q.s.p.....	para ajustar o pH em 8,0

### 2.5.2 Preparo

- 1) Pesar o EDTA e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar um pouco da água destilada.

- 3) Ajuste o pH em 8,0 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro.
- 4) Ajustar o volume em 100 mL, utilizando uma proveta.

## 2.6 SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 10M (para descarte dos tampões L6 e L2)

### 2.6.1 Composição

Hidróxido de sódio.....	200 g
Água destilada q.s.p.....	500 mL

### 2.6.2 Preparo

- 1) Pesar o hidróxido de sódio e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 500 mL, com auxílio de uma proveta.

## 2.7 SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 10% (para descontaminar o material)

### 2.7.1 Composição

Solução de hipoclorito de sódio comercial.....	200 g
Água destilada q.s.p.....	.1000 mL

### 2.7.2 Preparo

- 1) Medir o hipoclorito de sódio comercial em proveta e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 1000 mL, com auxílio de uma proveta, e homogeneizar.

## 2.8 SOLUÇÃO DE ETANOL 70%

### 2.8.1 Composição

Etanol 95%.....	700 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

### 2.8.2 Preparo

- 1) Medir o etanol e colocar em uma proveta.

- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 1000 mL e homogeneizar.
- 3) O uso do Alcoômetro de Gay-Lussac, quando disponível no laboratório, garante maior precisão no preparo da solução.

### **3 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PROCESSO DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

#### **3.1 TAMPÃO TBE 5X 0,5 M**

##### **3.1.1 Composição**

Tris (hidroximetil-tris-aminometano) (SIGMA®).....	54 g
EDTA 0,5M pH 8.....	20mL
Ácido Bórico.....	27,5g
Água destilada q.s.p. ....	1000mL

##### **3.1.2 Preparo**

- 1) Em um bécher de 1000mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético em 800mL de água.
- 2) O conteúdo foi transferido para proveta de 1000mL e o volume final completado.

#### **3.2. TAMPÃO TBE 1X 0,5 M, pH 8,4**

##### **3.2.1 Preparo**

- 1) Em uma proveta de 1000mL foram adicionados : 200mL do tampão TBE 5X e 800 mL de água destilada, perfazendo o volume final de 1000mL.
- 2) A solução foi transferida para um bécher de 1000mL, homogeneizada e posteriormente armazenada em frasco de vidro a 22-25°C.

#### **3.3 GEL DE AGAROSE A 1,5%**

### 3.3.1 Composição

Agarose (Invitrogen®).....	1,2g
Tampão TBE 1X 0,5M pH 8,4.....	80mL

### 3.3.2 Preparo

- 1) A agarose foi pesada e colocada em um erlenmeyer de 250mL.
- 2) Foram adicionado 80mL de tampão TBE 1X 0,5M. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas por 1minuto (em potência alta) até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C.
- 3) A seguir, a agarose foi colocada na cuba de eletroforese, tendo sido evitada a formação de bolhas.

## ANEXO A- PARECER 49



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF  
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 049/2007

Protocolo CEP-UFJF: 990.036.2007    FR: 124418    CAAE: 0028.0.180.000-07

Projeto de Pesquisa: "Estudo da prevalência da diarreia aguda em crianças atendidas em hospitais públicos e privados no município de Juiz de Fora – MG, e sua associação com os rotavírus"

Pesquisador Responsável: Mônica Couto Guedes Sejanos da Rocha

Pesquisadores Participantes: Maria Luzia da Rosa e Silva, Sandra Helena Cerrato Tibiriçá, Iná Pires de Carvalho, Gilmara Soares da Silva.

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora, ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.

### Sumário/comentários

O CEP analisou o Protocolo 990.036.2007, Grupo III e considerou que:

- Este é um estudo justificado pelos autores pela relevância de estudos epidemiológicos sobre as doenças diarreicas, em especial as rotaviruses. Segundo os autores, os dados obtidos poderão contribuir para um maior conhecimento desta infecção e dos tipos de rotavírus mais prevalentes em nosso meio, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde no município de Juiz de Fora.
- A metodologia a ser empregada para a investigação é adequada aos objetivos do estudo, e será baseada na coleta de dados clínicos em prontuários e análise de fezes para pesquisa de rotavírus, obtidas dos pacientes que apresentam sintomas de doença diarreica.
- O embasamento teórico apresentado sustenta o objetivo do estudo.
- Características da população a estudar: é proposta a avaliação de aproximadamente 5000 prontuários hospitalares de 2005 a 2008 de pacientes, crianças de 0 a 5 anos, atendidos em diferentes hospitais do município de Juiz de Fora, além da análise de aproximadamente 2000 amostras fecais coletadas de pacientes deste mesmo perfil atendidos nos hospitais participantes.
- O estudo prevê a coleta de dados em 4 hospitais, dois públicos (Santa Casa de Misericórdia e Hospital Universitário da UFJF) e dois privados (Hospital Albert Sabin e Hospital Monte Sinai). Encontra-se anexado ao protocolo documento de autorização da coleta de dados e material das instituições citadas.
- Os custos e planejamento orçamentário encontram-se anexados ao protocolo, sendo que o custeio será de responsabilidade do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, além de verba já existente em projeto apoiado pela FAPEMIG cujo termo de outorga foi apresentado.
- O cronograma foi devidamente apresentado em meses, considerando-se a provação do protocolo neste comitê em março de 2007, para o início da coleta de dados e materiais, com estudo previsto para 24 meses de duração.
- Avaliação de risco foi realizada, sendo a pesquisa classificada como de risco mínimo.
- O termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE está claro, em linguagem adequada para compreensão do sujeito, apresenta descrição suficiente dos procedimentos de coleta de dados, e considera a avaliação de risco.
- A qualificação do pesquisador responsável é pertinente para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.
- O pesquisador responsável deve encaminhar a este comitê um relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado  
Juiz de Fora, 17 de maio de 2007.

  
Prof. Dra. Ângela-Maria Golner  
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: ____ / ____ / 2007
ASS: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
 PRO-REITORIA DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFJF  
 36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Anexo ao Parecer nº 049/2007

Protocolo CEP-UFJF: 990.036.2007      FR: 124418      CAAE: 0028.0.180.000-07

Projeto de Pesquisa: "Estudo da prevalência da diarreia aguda em crianças atendidas em hospitais públicos e privados no município de Juiz de Fora – MG, e sua associação com os rotavirus"

Pesquisador Responsável: Mônica Couto Guedes Sejanas da Rocha

Pesquisadores Participantes: Maria Luzia da Rosa e Silva, Sandra Helena Cerrato Tibiriçá, Iná Pires de Carvalho, Gilmara Soares da Silva.

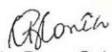
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora, ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.

Matéria Analisada: Solicitação de alteração da data de término do projeto

**Sumário/comentários**

O CEP/UFJF toma conhecimento da solicitação e da justificativa para alteração da data de término do referido projeto de pesquisa do ano de 2008 para o ano de 2010. Após avaliação do pedido e do parecer emitido, este Comitê manifesta-se pela aprovação da solicitação. Sendo assim, a documentação será anexada ao protocolo e será arquivada.

Juiz de Fora, 17 de abril de 2008

  
 Profa. Ms. Cyntia Pace Schmitz Correa  
 Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: _____ / _____ / 2008
ASS: _____

## ANEXO B- PARECER 58



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF  
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

## Parecer nº 058/2010

**Protocolo CEP-UFJF:** 1999.058.2010 **FR:** 320628 **CAAE:** 0032.0.180.000-10

**Projeto de Pesquisa:** Investigação epidemiológica de patógenos virais e bacterianos associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal, em crianças, na Zona da Mata Mineira.

**Versão do Protocolo e Data:** Primeira versão.

**Área Temática:** Grupo III.

**Pesquisador Responsável:** Maria Luzia da Rosa e Silva.

**TCLE:** Primeira versão.

**Pesquisadores Participantes:** Cláudio Gallupo Diniz, Vânia Lucia da Silva, Sandra Helena Cerrato Tibiriçá, Mônica Couto Guedes Sejanos da Rocha e Ivana Damásio.

**Instituição:** Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

**Sumário/comentários do protocolo:**

- Justificativa: Trata-se de temática relevante para o avanço científico sobre a gastrite aguda. A gastrite aguda é uma das doenças mais comuns na infância, acometendo crianças em todo o mundo. De alta morbidade, está associada, também, a altas taxas de mortalidade infantil, nos países em desenvolvimento. A definição dos agentes virais e bacterianos envolvidos nos casos é crucial para o manejo de pacientes, o tratamento adequado, desenvolvimento de medidas higiênicas sanitárias para evitar propagação, prevenção e mapeamento de possíveis reservatórios.
- Objetivo: O objetivo geral do projeto é levantar a caracterizar agentes virais e bacterianos envolvidos em casos de doença diarreica infantil. Esse objetivo está coerente com a justificativa apresentada.
- Metodologia: Serão analisadas pelo menos 500 amostras fecais provenientes de crianças de 0-5 anos de idade, atendidas em consultórios particulares de Juiz de Fora. A pesquisa de agentes virais será realizada por testes sorológicos e de biologia molecular, como eletroforese em gel de poliacrilamida, PCR e RT-PCR, para detecção e caracterização genotípica. A pesquisa de bactérias envolverá isolamento em meios de cultura, desenvolvimento de provas bioquímicas para a identificação e técnicas de biologia molecular para triagem, caracterização e pesquisa de genes de resistência e virulência.
- Revisão e referências: As referências apresentadas sustentam todo o projeto.
- Características da população a estudar: tamanho da amostra...no centro e no total...; faixa etária dos sujeitos....
- Lista de centros participantes no Brasil: Foram apresentadas três declarações de concordância e infraestrutura de médicas responsáveis por clínicas e duas declarações dos responsáveis pelos laboratórios da UFJF.
- Países participantes: Um.
- Orçamento: O orçamento será financiado por recursos já pertencentes aos pesquisadores.
- Cronograma: O cronograma apresentado está adequado para o pleno desenvolvimento da pesquisa.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE: Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, descreve os procedimentos, explica os riscos e desconfortos esperados, informa a possibilidade de ressarcimento de despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, informa o sujeito da pesquisa sobre reações adversas, forma do sujeito fazer contatos com o pesquisador informando que está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- Qualificação da pesquisadora: A pesquisadora apresenta experiência e competência para o desenvolvimento dessa pesquisa.
- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

**Situação:** Projeto Aprovado  
Juiz de Fora, 18 de março de 2010

  
Prof. Dr. Alfredo Chaoubah  
Coordenador em Exercício – CEP/UFJF

RECEBI

DATA: \_\_\_/\_\_\_/2010  
ASS: \_\_\_\_\_