

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE ADENOVÍRUS EM ASPIRADOS DE
NASOFARINGE DE CRIANÇAS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA,
ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG**

Aluno: Lysa Nepomuceno Luiz

Orientador: Dr. Júlio César Nepomuceno

Co-orientadora: Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

UBERLÂNDIA-MG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE ADENOVÍRUS EM ASPIRADOS DE
NASOFARINGE DE CRIANÇAS, COM DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA,
ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG**

LYSA NEPOMUCENO LUIZ

Orientador: Dr. Júlio César Nepomuceno

Co-orientadora: Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA-MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- L953i Luiz, Lysa Nepomuceno, 1980-
Identificação de sorotipos de adenovírus em aspirados de
nasofaringe de crianças, com doença respiratória aguda, atendidas em
Uberlândia, MG / Lysa Nepomuceno Luiz. - 2008.
42 f.
- Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Co-orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Doença respiratória infantil - Teses. I. Nepomuceno, Júlio
César. II. Queiroz, Divina Aparecida Oliveira. III. Universidade Fede-
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquí-
mica. IV. Título.

CDU: 616.2-053.2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE ADENOVÍRUS EM ASPIRADOS DE
NASOFARINGE DE CRIANÇAS, COM DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA,
ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG**

LYSA NEPOMUCENO LUIZ

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Dr. Foued Salmen Espindola

Data da defesa:

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas da PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Aos meus pais, Consuelo Nepomuceno e José Luiz dos Anjos, que nunca mediram esforços para contribuir com minha formação acadêmica e pessoal e que, mesmo privados de minha companhia, sempre me apoiaram e torceram para que todos os meus anseios se realizassem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela fé que suavizou minhas lutas e permitiu muitas vitórias

Aos meus pais, pela dedicação, compreensão, carinho e principalmente, pelo exemplo. A vocês, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos Marcos e Bruno pelo companheirismo, compreensão e carinho de sempre.

Ao Miro, Lorena Landerdahl e Carlos Roberto por fazerem parte de minha vida de uma maneira tão especial. Obrigada por tudo!

À Profa Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz pelos ensinamentos, carinho e confiança.

Ao Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno por acreditar em meus esforços e me aceitar, formalmente, como orientanda.

Ao Dr. Jonny Yokosawa pela atenção, carinho, ensinamentos e sugestões.

Ao Lourenço Costa, Bruno Carneiro, Thelma Mattos de Oliveira, Guilherme Freitas, Nayhane Tizzo, Lucas Zimon, Paulo, Tatiany Calegari e Gabriela Dyonísio pela amizade, ensinamentos, inúmeras sugestões e auxílio em diferentes etapas laboratoriais como coleta, processamento das amostras clínicas e parte das reações de imunofluorescência indireta.

À Juliana Ribeiro pela ajuda na análise estatística

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, Edson Pereira Filho e demais membros do Laboratório de Virologia Comparada/ Fiocruz-RJ, por viabilizarem grande parte dos experimentos, pelo carinho e pelos ensinamentos.

Aos médicos do Hospital de Clínicas de Uberlândia, Dr. Orlando C. Mantese, Dr. Hélio L. Silveira, Dr. Francisco C. Diniz e todos os demais médicos e residentes, pela seleção dos pacientes.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Imunologia, Parasitologia, Genética Molecular, Biologia Molecular, Fisiologia, pelos equipamentos e espaço físico cedidos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Às crianças que participaram deste trabalho e aos responsáveis que consentiram com a coleta dos espécimes clínicos.

Às amigas Mariana Moreira, Luciana Karen, Renata Brito, Sinara, Marine, Marília e Silmara Parreira, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos momentos inesquecíveis da mais pura alegria. Vocês são as melhores amigas que uma pessoa pode ter!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO ÚNICO	10
Resumo	11
Abstract	12
Introduction	13
Material and Methods	14
Results	18
Discussion	20
Acknowlegments	23
References	24

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL :	microlitro
Células A-549:	linhagem de células de carcinoma de pulmão humano
Células HEp-2:	linhagem de células de carcinoma epidermóide de laringe humana
CPE:	“cytopathic effect” (efeito citopático)
DNA:	ácido desoxirribonucléico
DRA/ARD:	doença respiratória aguda/“acute respiratory disease”
HAdV:	“human adenovirus” (adenovírus humano)
IFA:	“immunofluorescence assay” (ensaio de imunofluorescência)
IRA:	infecção respiratória aguda
MAbs:	“monoclonal antibodies” (anticorpos monoclonais)
NFA:	“nasopharyngeal aspirate” (aspirado de nasofaringe)
PCR:	“polymerase chain reaction” (reação em cadeia pela polimerase)
RT-PCR:	“reverse transcription-polymerase chain reaction” (transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase)
UV light:	luz ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Table 1:Results obtained by IFA, VI and PCR for adenoviruses detection in 468 specimens of NFA collected from children less than 5 years old, with acute respiratory disease	26
Table 2: Comparison of two PCR assays with 33 specimens that were previously positive specimens for presence of adenovirus	27
Table 3: Comparison of the results obtained, from DNA extracted from in natura samples, by the two PCR assays in 33 specimens previously positive for adenovirus	28
Table 4: Distribution of the 12 serotyped cases according to the involvement of symptoms	29

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Fig. 1: Partícula do adenovírus	2
---------------------------------------	---

CAPÍTULO ÚNICO

Fig. 1: Seasonal distribution of adenovirus-positive cases compared with the total number of collected samples during the study period.	30
--	----

Fig. 2: Phylogenetic tree referring to partial nucleotide sequences of the adenovirus hexon gene built with the program MEGA 3.1 by neighbor-joining method. Bootstrap values (from 1000 replicates) are indicated as a percentage in each node. The following published sequences were used: AdV1 (Accession numbers: AF 534906, AY 512566, AF 172246, DQ 149613), AdV2 (Accession numbers: AJ 293903, AJ 293901, AJ 293905, AJ 293904), AdV3 (Accession numbers: AY 854180, AY 854179, AY 854178, AY 854177), AdV 4 (Accession numbers: AY 337252, AY 337251, AY 337250, AY 337249) and for the outgroup (Accession number: KD 1264)	31
--	----

INTRODUÇÃO GERAL

Os vírus constituem importante causa de doenças respiratórias agudas (DRAs) em crianças menores de cinco anos de idade, respondendo por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WILLIAMS et al., 2002), sendo que aproximadamente 5% desses casos estão associados aos adenovírus (BRANDT et al., 1969).

Na década de 50 estes vírus foram isolados e caracterizados por dois grupos de pesquisadores que estudavam a etiologia de infecções respiratórias agudas (ROWE et al., 1953; HILLEMANN & WERNER, 1954). Diferentes denominações foram adotadas antes da atual: agentes da degeneração da adenóide, da doença da adenóide-faringe-conjuntiva ou da doença respiratória aguda. Somente em 1956 passaram a ser denominados adenovírus, tendo em vista que o isolamento original foi realizado a partir de tecidos de adenóides (ENDERS et al., 1956).

Os adenovírus humanos pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, da família *Adenoviridae*. São conhecidos 51 sorotipos, classificados em 6 espécies (A a F) (de JONG et al., 1999), baseado na sua capacidade de aglutinar vários tipos de eritrócitos. Outras propriedades virais tais como relações antigênicas, tamanho da fibra, grau de homologia do DNA, percentual das bases nitrogenadas guanina e citosina, número de fragmentos de clivagem após digestão com a endonuclease *SmaI* e massa molecular de certas proteínas internas tendem a coincidir com esta classificação (SWENSON et al., 2003).

São vírus DNA de fita dupla, de simetria icosaédrica, de 70 a 90 nm de diâmetro, não envelopados e são constituídos por 10 proteínas estruturais. O capsídeo protéico é

formado por 252 capsômeros, sendo 240 hexons e 12 pentons. Cada unidade do penton é constituída por uma base da qual se projeta a fibra (HIERHOLZER et al., 1989) (Fig. 1).

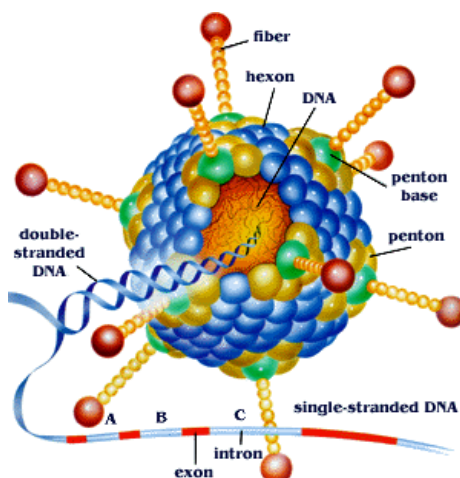


Fig. 1: Partícula do adenovírus

<http://iavireport.org/Issues/Issue 11-1/Winner.asp>

Além de acometerem o trato respiratório, os adenovírus causam uma variedade de outras síndromes, incluindo doenças oculares, gastroenterites e infecções urinárias (SHENK, 2001). Embora a maioria seja autolimitante, esses vírus podem estar associados a doenças graves ou letais tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos saudáveis (MUNOZ et al., 1998).

Nas décadas de 50 e 60, esses vírus foram reconhecidos como um dos mais importantes responsáveis por doenças respiratórias entre recrutas militares nos Estados Unidos (TOP, 1975). O impacto dos adenovírus nesta população estimulou o desenvolvimento de vacinas contra os sorotipos 4 e 7. Entretanto, a produção das duas vacinas foi descontinuada em 1996, acarretando no ressurgimento de epidemias em vários centros de treinamento militares por esses vírus (GRAY et al., 1999).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por isolamento viral em cultura de células, testes sorológicos ou por imunofluorescência (MUNOZ et al., 1998). Entretanto, tem sido

crescente o emprego da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tendo em vista a rapidez e a elevada sensibilidade deste método (OSIOWY, 1998).

Trabalhos realizados em diferentes países têm mostrado um percentual de detecção desses vírus de aproximadamente 7,0% em crianças com doença respiratória aguda (DRA) (ROCHOLL et al., 2004; VIEGAS et al., 2003). No Brasil, resultados similares têm sido reportados. Em Porto Alegre, Stralliotto et al. (2002), encontraram um percentual de 6% de positividade em crianças com DRA. Em Salvador, o percentual encontrado por Moura et al. (2003) foi de 7,1% em crianças atendidas em emergência e em enfermarias de um centro pediátrico da cidade, e em São Paulo, outro grupo de pesquisadores encontrou um percentual de 8,2% em crianças internadas, sendo a maioria com IRA e menores de 5 anos de idade (MOURA et al. 2007).

Diferentes fatores devem ser considerados ao se analisar a prevalência destes vírus, incluindo o método de diagnóstico empregado, a gravidade da doença, a idade dos pacientes e o período da coleta dos espécimes clínicos (ECHAVARRIA et al., 2006).

Referente à DRA, além da detecção viral, a determinação dos sorotipos constitui outro dado importante, considerando-se que certos sorotipos como o 7 e 3 são mais freqüentemente associados a surtos de infecções graves do trato respiratório (HONG et al., 2001; KIM et al., 2003), embora outros sorotipos da espécie B (AdV 14, 16, 21, 34, 35), da espécie C (Ad1, 2, 5, 6) e da espécie E (Ad4) também sejam responsáveis por DRAs em crianças e militares (WADELL, 1984; HORWITZ, 2001).

Um estudo realizado a partir dos casos positivos para adenovírus coletados de crianças hospitalizadas por doença respiratória aguda inferior nas cidades de Buenos Aires, Santiago e Montevideu, demonstrou que 71,0% dos isolados pertenciam à espécie B, 28,5% à espécie C e somente 0,6% à espécie E, sendo o sorotipo 7, mais especificamente o tipo genômico 7h, responsável por 94,4% (17/18) dos casos fatais registrados durante o

estudo (KAJON et al, 1996). Entretanto, além do sorotipo, outros fatores podem influenciar na gravidade da doença, como: idade, condição socioeconômica e fatores ambientais (HONG et al, 2001).

A transmissão nosocomial constitui outro problema freqüentemente associado aos adenovírus. O fato de responderem por cerca de 10,0% dos casos de pneumonia, que freqüentemente necessitam de suporte de terapia intensiva, associado à excreção destes vírus pelas fezes por longos períodos e a transmissão tanto por fômites quanto por aerossóis ajudam a explicar tal transmissão (HIERHOLZER, 1989). Além disso, tem sido observado que muitas crianças com DRA por esses vírus desenvolvem alguma seqüela pulmonar (LANG et al, 1969; SIMILA et al, 1981).

Neste trabalho, pesquisou-se adenovírus em aspirados de nasofaringe de crianças menores de 5 anos de idade com DRA, atendidas em Uberlândia, MG, no período de novembro de 2000 a abril de 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDT, C. D.; KIM, H. W.; VARGOSKO, A. J.; JEFFRIES, B. C.; ARROBIO, J. O., RINDGE, B. PARROTT, R. H.; CHANOCK, R. M. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. **Am J Epidemiol**, v.90, n.6, p.484-500, Dec. 1969.

DE JONG, J. C.; WERMENBOL, A. G.; VERWEIJ-UIJTERWAAL, M. W.; SLATERUS, K. W.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DOORNUM, G. J.; KHOO, S. H.; HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **J Clin Microbiol**, v.37, n.12, p.3940-3945, Dec. 1999.

ECHAVARRIA, M.; MALDONADO, D.; ELBERT, G.; VIDELA, C.; RAPPAPORT, R.; CARBALLAL, G. Use of PCR to demonstrate presence of adenovirus species B, C or F as well as coinfection with two adenovirus species in children with flu-like symptoms. **J. Clin. Microbiol**, v.44, n.2, p.625-627, Feb. 2006.

ENDERS, J. F.; BELL, J. A.; DINGLE, J. H.; FRANCIS, T. JR.; HILLEMANN, M. R.; HUEBNER, R. J.; PAYNE, A. M. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. **Science**, v.124, n.3212, p.119-120, Jul. 1956.

GRAY, G. C.; GOSWAMI, P. R.; MALASIG, M. D; HAWKSWORTH, A. H.; TRUMP, D. H.; RYAN, M. A.; SCHNURR, D. P. Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. **Clin. Infect. Dis**, v.31, p.663-670. 2000.

HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.85, n.1, p.183-188, Jan. 1954.

HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses. In: Achmidt, N. J., Emmons, R. W. (Ed.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1989. p.219-264.

HONG, J. Y.; LEE, H. J.; PIEDRA, P. A.; CHOI, E. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. Y.; KIM, W. S. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. **Clin Infect Dis**, v.32, n.10, p.1423-1429, May. 2001.

HORWITZ, M. S. ADENOVIRUSES. IN: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, Pa: Lippincott/The Williams & Wilkins Co., 2001. p.2301-2326

KAJON, A. E.; MISTCHENKO, A. S.; VIDELA, C.; HORTAL, M.; WADELL, G.; AVENDANO, L. F. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). **J Med Virol**, v.48, n.2, p.151-156, Feb. 1996.

KIM, Y. J.; HONG, J. Y.; LEE, H. J.; SHIN, S. H.; KIM, Y. K.; INADA, T.; HASHIDO, M.; PIEDRA, P. A. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. **J Clin Microbiol**, v.41, n.10, p.4594-4599, Oct. 2003.

LANG, W. R.; HOWDEN, C. W.; LAWS, J.; BURTON, J. F. Bronchopneumonia with serious sequelae in children with evidence of adenovirus type 21 infection. **Br Med J**, v.1, n.5636, p.73-79, Jan. 1969.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; SOUZA, L. S. F.; RIBEIRO, D. H.; SIQUEIRA, M. M.; RAMOS, E. A. G. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.275, 2003.

MOURA, P. O.; ROBERTO, A. F.; HEIN, N.; BALDACCI, E.; VIEIRA, S. E.; EJZENBERG, B.; PERRINI, P.; STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; MEHNERT, D. U.; HARSI, C. M. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in Sao Paulo, Brazil. **J Med Virol**, v.79, n.2, p.174-181, Feb. 2007.

MUNOZ, F. M.; PIEDRA, P. A.; DEMOLER, G. J. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. **Clin Infect Dis**, v.27, n.5, p.1194-1200, Nov. 1998.

OSIOWY, C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. **J Clin Microbiol**, v.36, n.11, p.3149-3154, Nov. 1998.

ROCHOLL, C.; GERBER, K.; DALY, J.; PAVIA, A. T.; BYINGTON, C. L. Adenoviral infections: the impact of rapid diagnosis. **Pediatrics**, v.113, n.1, p. 51-56, Jan. 2004.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.84, p.570-573, 1953.

SHENK, T. E. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. E. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, Pa: Lippincott/The Williams & Wilkins Co., 2001. p.2265-2300

SIMILA, S.; LINNA, O.; LANNING, P.; HEIKKINEN, E.; ALA-HOUHALA, M. Chronic lung damage caused by adenovirus type 7: a ten-year follow-up study. **Chest**, v.80, n.2, p.127-31, Aug. 1981.

STRALLIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B.; CUNHA, M. L.; NESTOR, S. M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.283-291, 2002.

SWENSON, P. D.; WADELL, G.; ALLARD, A.; HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses. In: P. R. MURRAY, E. J. BARON, et al (Ed.). **Manual of Clinical Virology**. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. p.1404-1417.

TOP, F. H., Jr. Control of adenovirus acute respiratory disease in U.S. Army trainees. **Yale J Biol Med**, v.48, n.3, p.185-195, Jul. 1975.

VIEGAS, M.; BARRERO, P. R.; MAFFEY, A. F.; MISTCHENKO, A. S. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina. A five-year analysis. **Journal of Infection**, v. 49, p.222–228, 2004.

WADELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.110, p.191-220, 1984.

WILLIAMS, B. G.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet Infect Dis**, v.2, p.25-32, 2002.

Capítulo Único

ADENOVIRUS SEROTYPES IN NASOPHARINGEAL ASPIRATES OF CHILDREN PRESENTING ACUTE RESPIRATORY DISEASE, ATTENDED IN UBERLÂNDIA, MG

Manuscrito a ser submetido ao Journal of Clinical Virology

Uberlândia
2008

Resumo

Introdução: Adenovírus (AdVs) constituem importante causa de doença respiratória aguda (DRA), gastroenterites, conjuntivites e infecções urinárias em humanos.

Objetivos: Detecção de AdVs por imunofluorescência indireta (IFI) e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) em aspirados de nasofaringe de crianças menores de 5 anos de idade, com DRA, atendidas em Uberlândia, MG, assim como, comparação de dois testes de PCR e identificação de sorotipos de AdVs circulantes na região.

Material e Métodos: Um total de 468 espécimes clínicos obtidos de novembro de 2000 a abril de 2007 foi testado pela IFI para detecção de AdVs e outros vírus respiratórios. Em seguida, o DNA das 126 amostras *in natura* que obtiveram resultado negativo /inconclusivo pela IFI e que também foram negativas para rinovírus pela RT-PCR, foi extraído por Trizol[®] e testado pela PCR_{Araújo} (Araújo et al., 2001) para os AdVs. Os espécimes positivos para AdVs foram inoculados em células HEp-2 e A549. Além disso, o DNA das amostras positivas, tanto *in natura* quanto do raspado de cultura de células, foi extraído utilizando-se o kit “QIAmp DNA Mini Kit” (QIAGENTM Valencia, CA) e testado novamente pela PCR_{Araújo} e pela PCR_{Allard} (Allard et al., 2001), afim de comparar a sensibilidade/especificidade dos dois testes. Além disso, os sorotipos foram identificados a partir do seqüenciamento dos nucleotídeos de produtos de PCR positivos para AdVs.

Resultados: Das 468 amostras, 33 (7,1%) foram positivas para AdVs, sendo 14 pela IFI e 19 pela PCR_{Araújo}. De 32 espécimes inoculados em cultura de células, foi possível isolar os AdVs de 16. A comparação dos resultados obtidos a partir do DNA das 33 amostras *in natura*, extraídas por coluna, mostrou que a sensibilidade da PCR_{Araújo} foi ligeiramente superior à da PCR_{Allard} (92,9% and 90,0%, respectivamente). Entretanto, a primeira PCR apresentou uma especificidade consideravelmente menor que a segunda PCR (57,9% and 91,3% respectivamente). O sorotipo AdV2 foi detectado em quase 60,0% (7/12) dos identificados.

Conclusões: Os AdVs foram detectados em 7,1% das amostras clínicas de crianças com DRA mediante a combinação de dois métodos, IFI e PCR. A análise da sensibilidade e da especificidade dos dois métodos de PCR empregados, mostrou que a PCR_{Allard} apresentou sensibilidade ligeiramente inferior à PCR_{Araújo} e especificidade consideravelmente superior. O sorotipo AdV2 foi identificado em 7 das 12 amostras de AdVs seqüenciadas.

Palavras-chave: adenovírus, sorotipos, doença respiratória aguda, crianças.

Abstract

Background: Adenoviruses (AdVs) are important cause of acute respiratory disease (ARD), gastroenteritis, conjunctivitis and urinary infections in humans.

Objectives: Detection of AdVs by immunofluorescence assay (IFA) and by polymerase chain reaction (PCR) in nasopharyngeal aspirates of children less than 5 years old presenting ARD in Uberlândia, MG, as well as, comparison of two PCR assays and identification of serotypes that circulated in this region.

Study Design: A total of 468 clinical specimens was collected from November 2000 to April 2007 and tested by IFA for adenovirus detection and other viruses. After that, the DNA of the 126 *in natura* negative/inconclusive samples by IFA which were also negative for rhinovirus by RT-PCR, were extracted by Trizol[®] and tested by PCR_{Araújo} (Araújo et al, 2001) for adenovirus detection. The positive specimens for adenovirus were inoculated into HEp-2 and A-549 continuous cell lineages. In addition, the DNA of either, *in natura* samples and cell culture-scrapped samples, were extracted by using the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGENTM Valencia, CA) and tested again by PCR_{Araújo} and by PCR_{Allard} (Allard et al., 2001) in order to compare the sensitivity/specificity of both tests. In addition, the serotypes were identified from the nucleotide sequencing of PCR products positive for adenovirus.

Results: From the 468 samples, 33 (7.1%) were positive for AdVs, 14 by IFA and 19 by PCR_{Araújo}. From the 32 specimens inoculated in cell culture, it was possible to isolate AdVs in 16. The comparison of the results obtained from the DNA of the 33 *in natura* samples extracted by the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGENTM Valencia, CA) showed that the sensibility of PCR_{Araújo} was a little higher than PCR_{Allard} (92.9% and 90.0%, respectively). However, the first PCR presented a lower specificity than the second one (57.9% and 91.3%, respectively). The serotype AdV2 was detected in almost 60.0% (7/12) of those identified.

Conclusions: AdVs were detected in 7.1% of the clinical samples in children with ARD through the combination of two methods, IFA and PCR. The analysis of the sensibility and specificity of the two PCR assays, showed that PCR_{Allard} presented a little lower sensibility than PCR_{Araújo} and higher specificity. The serotype AdV2 was identified in 7 of the 12 AdVs sequenced samples.

Keywords: adenovirus, serotypes, acute respiratory disease, children.

Introduction

Acute respiratory diseases (ARDs) are the main cause of morbidity and mortality among children younger than 5 years old (Garbino et al., 2004), and about 5% of these cases are associated with adenovirus (Brandt et al., 1969). This virus belongs to the *Adenoviridae* family, which comprises 51 human serotypes, classified into six species (A-F) (De Jong et al., 1999).

Conventional methods of direct diagnosis for adenovirus detection include the isolation in cell culture and immunofluorescence assay. Isolation in cell culture presents a good sensitivity; however, it demands time (O'Neill et al 1996). On the other hand, although the immunofluorescence constitutes a rapid diagnosis method, it is relatively insensitive (Swenson et al., 2003). Considering this, the use of techniques such as polymerase chain reaction (PCR) for adenovirus detection is a good alternative since it offers both, fast diagnostic result and high sensitivity (Osiowy, 1998).

In addition to adenovirus detection, determination of serotypes is of great clinical interest, since specific serotypes are frequently associated to the manifestation and severity of the disease (Hong et al., 2001). Indeed, among all identified serotypes, adenovirus serotype 7 (HAdV7) is the most frequently associated with serious or fatal respiratory disease (Carballal et al., 2002).

The purpose of this study was to detect adenovirus by immunofluorescence assay and by polymerase chain reaction in Uberlândia, MG, Brazil, as well as, to compare two PCR assays and to identify the serotypes that circulated in this region

Material and Methods

Patients and specimens - From April 2000 to April 2007, a total of 468 nasopharyngeal aspirate (NFA) samples were collected from children less than five years old presenting acute respiratory disease (ARD), in order to investigate respiratory viruses.

NFA were collected and processed according to Ribeiro et al., 2007 at Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU) and Laboratório de Virologia/Universidade Federal de Uberlândia (UFU), respectively.

The project was submitted and approved by the Ethics and Research Consil of UFU (annex A, B, C and D). A written consent was obtained from each child's parent or foster parent (annex E).

Detection of adenovirus by indirect immunofluorescence assay (IFA) – An initial screening was carried out by IFA using the *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification kit* (Chemicon International, Inc. Temecula, CA. USA), following manufacturer's instructions. The definition of results (positive, negative and inconclusive) followed the criteria established by Queiroz et al. (2002). Samples that were negative or inconclusive by IFA were tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect rhinovirus and the negative ones were tested by PCR for adenovirus detection.

Detection of adenovirus by polymerase chain reaction (PCR) - DNA of the 126 negative or inconclusive samples by IFA and negative for rhinovirus by RT-PCR was extracted by Trizol® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) method, following the manufacturer's instructions.

PCR was carried out using the primers described by Araújo et al, (2001), with one modification: an addition of one nucleotide in the reverse primer. These primers were based on the Hierholzer et al. (1993) ones. The sequences of the inner and outer pair of primers are: 5' - TGA CTT TTG AGG TGG ATC CCA TGG – 3', 5' - GGT CTC GAT GAC GCC GCG GTG C - 3' and 5' - GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA- 3', 5' - TAC GCC AAC TCC GCC CAC GCG CT - 3', respectively. After PCR, 5µl of the product generated by the amplification reaction was submitted to electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and bands were visualized under UV light.

Isolation of adenovirus in cell culture – Adenovirus-positive samples by IFA and/or PCR according to Araújo et al, 2001, were inoculated into HEp-2 and A-549 continuous cell lineages. Briefly, 100µl of the NFA was inoculated into each well of a 12-well polystyrene microplate containing a semi-confluent cellular monolayer of each cell line. The plates were incubated under a 5% CO₂ atmosphere and at 37°C for viral adsorption. After 30 minutes, 900 µL of Dulbecco's minimum essential medium (Gibco-BRL Life Technologies) supplemented with 2% fetal calf serum was added. Cultures were observed daily until observation of cytopathic effect (CPE) and then cells were collected for IFA and PCR; When CPE was not observed cultures were maintained up to seven days and a sub-culture was done to confirm the negativity – by IFA and PCR.

Characterization of the adenoviruses: Considering that the Trizol-extracted DNA was insufficient for a molecular characterization, a new DNA extraction of the positive samples was carried out, using the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGENTM Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions. These DNA samples were submitted to another PCR assay,

according to (Allard et al., 2001), in order to characterize the adenovirus specimens by nucleotide sequencing. In addition, to compare the sensitivity/specificity of the two PCR assays, the first one was repeated using the same DNA aliquot extracted by the kit above mentioned. DNA of cell culture-scrapped samples was also extracted and tested by the two PCR assays.

After PCR, 10 μ l of the amplified product were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel stained with SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Bands were visualized under UV light.

Purification of PCR products: Purification of PCR products was carried out using the QIAquick™ PCR purification kit (QIAGEN, Inc. Valencia, CA. USA). Then purified DNA was submitted to agarose gel electrophoresis and DNA concentration was determined by comparison to Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA).

Sequencing and phylogenetic analyses: Nucleotide sequencing of both strands of PCR products positive for adenovirus was carried out by using ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Bio Systems. Foster City, CA. USA). Nucleotide sequencing edition and phylogenetic analysis were carried out using the programs BioEdit (Hall, 1999) and MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004), respectively.

Statistical analysis: To analyze the sensitivity/specificity of the two PCR assays we compare the results obtained by these assays with the results obtained by cell culture and with an expanded gold standard. The last one defined a true positive sample as one that was positive for adenovirus in more than one assay, considering IFA, cell culture and the

analyzed PCR. Just the results obtained by PCR assays from *in natura* samples extracted by the DNA extraction kit were considered.

Results

From the total of 468 children nasopharyngeal aspirates tested by IFA, approximately 3% (14/468) were positive for adenovirus. Using PCR in the Trizol-extracted DNA of the 126 *in natura* negative/inconclusive samples by IFA which were also negative for rhinovirus by RT-PCR, 19 additional adenoviruses were detected, resulting in a total of 33 adenoviruses samples (approximately 7.1% for these viruses). Of the 32 inoculated in cell culture, adenovirus was confirmed by IFA in 34.4% (11/32) (Table 1). Besides that, adenovirus was confirmed by PCR in 5 additional samples, totalizing 16 (50%) isolates.

Seasonal distribution of the 33 adenovirus positive cases showed that almost 50% (16/33) were detected during autumn, although this virus circulated in all year seasons. None case was detected in the studied months of 2007 (Fig. 1). The median age was 13 months old year. No significant difference between the genders was observed.

When submitting the DNA of the 33 *in natura* samples extracted by column method to the two PCR assays, we noticed that using primers described by Allard et al. (2001), 32.3% (11/33) was positive. On the other hand, when using primers described by Araújo et al. (2001), the detection rate increased to 63.6% (21/33). Furthermore, when DNA from scrapped cells of inoculated cultures of negative samples was tested, five additional cases were detected in both reactions (Table 2). Also, 3 *in natura* samples that were positive by IFA were not positive by none of the PCR assays. In addition, results of 4 *in natura* samples that were positive by PCR from Trizol-extracted DNA were not reproduced by none of PCR assays that were carried out from column-extracted DNA (Table 2).

The PCR assay described by Araújo et al. (2001) showed higher sensitivity than the one described by Allard et al. (2001), however its specificity and positive predictive value were lower, according to Table 3.

Of the 16 adenovirus positive samples by PCR according to Allard et al. (2001), we were able to obtain nucleotide sequence of 12 specimens. Analyses by BLAST and by comparison to sequences obtained from *GenBank* revealed that the specimens of our study showed high identity to sequences of species B, C and E. Also, a phylogenetic tree with the nucleotide sequences obtained in our study and the sequences from GenBank that showed high identity with ours was constructed (Fig. 2). These analyses showed that the characterized adenovirus specimens that circulated in this region are distributed according to the following: eight specimens of species C (seven AdV2 and one AdV1), three of species B (AdV3) and one of species E (AdV4). Upper respiratory tract involvement was verified in approximately 66.7% (8/12) of these cases. (Table 4).

Discussion

The percentage of approximately 7.1% (33/468) observed for adenovirus is similar to earlier studies that have documented that these viruses are responsible for about 7% to 8% of the acute respiratory disease in children (Brandt et al., 1969; Foy, 1997), which reinforces its importance.

Although IFA constitutes a not expensive and rapid diagnostic method, the use of PCR was of great importance in the detection of these viruses, considering its higher sensitivity rate, which was increased from 3% to 7%. In addition, 5 samples that were inoculated in cell culture and had a negative result by IFA, had its isolation confirmed by PCR.

Although other reports demonstrated a specificity of approximately 99% of IFA (Mitchell et al., 2003; Larrañaga, 2007), 21.4% (3/14) of the positive samples for adenovirus by IFA was negative by all other tested methods (virus inoculation in cell culture and PCR assay), which suggest that these results might be false-positives. This fact can be attributed to mistakes in the interpretation of IFA, considering the subjectivity of the method (Ascher & Wilber 1990; Malan, et al. 2003) and the alternation of the personnel during the period of the study. In addition, 4 positive cases by PCR from Trizol-extracted DNA were not positive by the 2 PCR assays tested by using column-extracted DNA, even when using the same conditions of the first assay. These results indicated that difference in DNA extraction method may affect the sensitivity of the detection of the virus.

The calculation of the sensitivity of the two PCR assays show that the reaction using the conditions described by Araújo et al. (2001) was more sensitive than using those described for Allard et al. (2001) (90.9% and 72.7%, respectively, using the virus isolation as a gold standard and 92.9% and 90.0%, respectively, using the previously defined

expanded gold standard). The fact that 4 DNA samples extracted from *in natura* specimens were positive by Araújo et al. (2001), and by Allard et al. (2001) were positive only after testing the DNA extracted from cell culture, emphasize these data. However, the number of positive cases here detected according to Allard et al. (2001) may have been underestimated since the Nested-PCR described by these authors, was not carried out due to primers shortage.

On the other side, the specificity of PCR according to Allard et al. (2001) was much higher (90.5% and 52.4%, using the virus isolation as a gold standard and 91.3% and 57.9%, using the previously defined expanded gold standard).

It is important to mention that detection of adenovirus in samples does not mean that it is the etiologic agent of the disease in all cases, considering that species C adenoviruses can be excreted for long periods after the infection (Fox et al, 1977) and it was not our objective to investigate cases of coinfections.

The detection of adenovirus circulation throughout the year is similar to what was reported by other authors (Viegas et al., 2004; Cabello et al., 2006). However, approximately one half of the cases was detected in autumn. It may have happened due to the higher number of specimens collected in this season.

The serotypes identified in this study are in accordance with the literature, in which the more frequently involved in respiratory tract infections are AdV3, 7, 14, 16, 21 and 35 (of species B), AdV1, 2, 5 and 6 (of species C) and AdV4 (of species E) (Hierholzer, 1989; Swenson et al., 2003). However, AdV4 is not very common in children (Schmitz et al., 1983). This serotype is most frequently associated with acute respiratory disease among military recruits (Gaydos & Gaydos, 1995, Dingle & Langmuir, 1968). In our study, the nucleotide sequence of AdV4 hexon gene fragment showed 100% identity with adenovirus

serotype 4 isolated from basic training recruits in United States in the end of 90's (Choi et al, 2006).

In addition, we observed 100% identity between the nucleotide sequence of AdV1 and a feline adenovirus reported by Lakatos et al, (1999) and Pring-Akerblom & Ongradi (only available on GenBank) (Accession numbers: AF172246 and AY512566, respectively). In Japan one adenovirus strain bearing feline adenovirus gene was also detected in a fecal specimen collected from a 1-year old child with gastroenteritis, providing evidence of adenovirus type 1 transmission between humans and animals (Phan et al, 2006).

From the total of 4 lower respiratory tract infections cases, 3 were associated with specie C serotypes, although some reports have found a higher association between lower respiratory tract infections and specie B adenoviruses (Kajon et al., 1996, Carballal et al., 2002, Hong et al., 2001).

In conclusion, through the combination of IFA and PCR, it was possible to detect adenoviruses in 7.1% of the clinical samples in children presenting ARD. The analysis of the sensibility and specificity of the two PCR assays, showed that PCR using the conditions described by Araújo et al. (2001) presented a sensibility higher than PCR using the conditions described by Allard et al. (2001), however its specificity was considerable lower. The serotype AdV2 was identified in 7 of the 12 PCR products positive for adenovirus sequenced.

It is important to continue detecting and characterizing adenovirus in children with acute respiratory disease in order to better understand the association between adenovirus serotypes and respiratory syndromes.

Acknowledgments

We thank Dr Dean D Erdman, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA and Dr. Marilda Siqueira, Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, for providing the *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification kit*; the laboratories of Immunology, Parasitology, Molecular Biology, Physiology, and Genetics, UFU, MG, for their equipments and the health care professionals of the Hospital de Clínicas de Uberlândia for the screening of patients.

References

- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:498-505.
- Araújo AA, Yokosawa, J., Durigon, E. L., Ventura, A. M. Polymerase chain reaction detection of adenovirus DNA sequences in human lymphocytes. *Brazilian Journal of Microbiology* 2001; 32: 1886-1891.
- Ascher MS, Wilber JC. Immunofluorescence for serodiagnosis of retrovirus infection. *Arch Pathol Lab Med*. 1990;114:246-248.
- Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, Jeffries BC, Arrobio JO, Rindge B, Parrott RH, Chanock RM. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 1969; 90:484-500.
- Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:21-24.
- Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Mdel C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 2:6.
- Choi EH, Kim HS, Park KH, Lee HJ. Genetic heterogeneity of the hexon gene of adenovirus type 3 over a 9-year period in Korea. *J Med Virol* 2006; 78:379-383.
- De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3940-3945.
- Dingle JH, Langmuir AD. Epidemiology of acute, respiratory disease in military recruits. *Am Rev Respir Dis* 1968; 97(6):Suppl:1-65.
- Foy HM. Adenoviruses. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral infections of humans: epidemiology and control*. 4th ed. Plenum Publishing; 1997; 119-138.
- Fox JP, Hall CE, Cooney MK. The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol*, 1977; 105: 362-86.
- Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Kolarova L, Nicod LP, Rochat T, Kaiser L. Respiratory viruses and severe lower respiratory tract complications in hospitalized patients. *Chest* 2004; 125:1033-1039.
- Gaydos CA, Gaydos JC. Adenovirus vaccines in the U.S. military. *Mil Med* 1995; 160:300-304.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment edit and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hierholzer JC. Adenoviruses. In: Achmidt NJ, Emmons RW, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 6th ed. American Public Health Association; 1989. p 219-264.
- Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, McDonough MM. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1886-1891.
- Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, Kim WS. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1423-1429.
- Kajon, AE, Mistchenko, AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendano LF. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996; 48:151-156.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lakatos B, Farkas J, Egberink HF, Vennema H, Horzinek MC, Benko M. Detection of adenovirus hexon sequence in a cat by polymerase chain reaction (short communication). *Acta Vet Hung* 1999; 47:493-497.
- Larrañaga C, Jorge Martínez H., Angélica Palomino M., Mónica Peña C., Flavio Carrión A., Luís Fidel Avendaño. Molecular characterization of hospital-acquired adenovirus infantile respiratory infection in Chile using species-specific PCR assays. *Journal of Clinical Virology* 2007; 39:175-181.
- Malan, AK, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3060-3063.
- Mitchell S, O'Neill HJ, Ong GM, Christie S, Duprex P, Wyatt DE, McCaughey C, Armstrong VJ, Feeney S, Metwally L, Coyle PV. Clinical assessment of a generic DNA amplification assay for the identification of respiratory adenovirus infections. *J Clin Virol* 2003; 26:331-338.

- O'Neill HJ, Russell JD, Wyatt DE, McCaughey C, Coyle PV. Isolation of viruses from clinical specimens in microtitre plates with cells inoculated in suspension. *J Virol Methods* 1996; 62:169-78.
- Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3149-3154.
- Phan TG, Shimizu H, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 2006; 52:515-518.
- Queiróz DAO, Durigon, EL., Botosso, VF., Ejzenberg B., Vieira, SE., Mineo, JR., Yamashita, C., Hein, N., Lopes, CL., Cacharro, AL., Stewien, KE. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35:1183 - 1193.
- Ribeiro LZG, Tripp RA, Rossi, LMG, Palma PVB, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TFM, Nepomuceno LL, Queiroz, DAO. Serum mannose-binding lectin levels are linked with respiratory syncytial virus (RSV) disease. *J Clin Immunol*, 2008; 20: p.(in press).
- Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117:455-466.
- Swenson PD, Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White, O, editors. *Manual of Clinical Virology*. 8th ed. ASM Press; 2003. p 1404-1417.
- Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mischenko AS. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina. A five years analysis. *Journal of Infection* 2004; 49:222-228.

Table 1: Results obtained by IFA, VI and PCR for adenoviruses detection in 468 specimens of NFA collected from children less than 5 years old, with acute respiratory disease

	IFA	PCR _{Araújo}	VI	Total
	+	+	+	4
	+	-	+	3
	-	+	+	4
	-	+	-	15
	+	-	-	6
	+	+	NT	1
	-	NT	NT	328
	-	-	NT	107
Total	468	126	32	468

IFA: indirect immunofluorescence assay; PCR: polymerase chain reaction using the conditions described by Araújo et al, 2001, carried out from the Trizol-extracted DNA; VI: virus isolation confirmed by IFA; NT: not tested

Table 2: Comparison of two PCR assays with 33 specimens that were previously positive specimens for presence of adenovirus

Sample no.	PCR _{Allard}	PCR _{Araújo}
7	-	+
41	-	+
47	-	+
53	-	-
56	+*	+
103	+	+
105	+	+
121	-	-
124	-	-
125	+	+
128	+*	+*
137	-	+*
147	-	-
153	-	+*
157	+	+
179	-	-
197	+	+
201	+	+
209	+*	+
210	-	+
245	-	+*
247	-	-
251	+*	+
313	-	+
327	+	+
351	+	+
405	+	+
410	-	+*
412	-	-
415	-	+
425	+*	+
432	+	+
451	+	+

PCR_{Allard}: Polymerase chain reaction using the conditions described by Allard et al, 2001; PCR_{Araújo}:

Polymerase chain reaction using the conditions described by Araújo et al 2001. Both PCRs were performed at column-extracted DNA.

+: Positive by testing DNA extracted from *in natura* samples

+*: Negative by testing DNA extracted from *in natura* samples, but positive by testing DNA of cell culture-scraped samples

Table 3: Comparison of the results obtained, from DNA extracted from *in natura* samples, by the two PCR assays in 33 specimens previously positive for adenovirus

			Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
VI confirmed by IFA						
PCR _{Allard}	(+)	(-)				
	8	2	72.7	90.5	79.9	86.3
	3	19				
VI confirmed by IFA						
PCR _{Araújo}	(+)	(-)				
	10	10	90.9	52.4	50.0	91.7
	1	11				
Expanded gold standard						
PCR _{Allard}	(+)	(-)				
	9	2	90.0	91.3	81.8	95.4
	1	21				
Expanded gold standard						
PCR _{Araújo}	(+)	(-)				
	13	8	92.9	57.9	61.8	91.6
	1	11				

PCR_{Allard}: Polymerase chain reaction according to Allard et al, 2001; PCR_{Araújo}: Polymerase chain reaction according to Araújo et al, 2001; VI: Virus isolation confirmed by IFA; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value.

Table 4: Distribution of the 12 serotyped cases according to the involvement of symptoms

Species and serotypes		URTI	LRTI	URTI and LRTI
B	AdV3	2	-	1
C	AdV1	1	-	-
	AdV2	4	3	-
E	AdV4	1	-	-
Total		8	3	1

URTI: Upper respiratory tract infection; LRTI: Lower respiratory tract infection

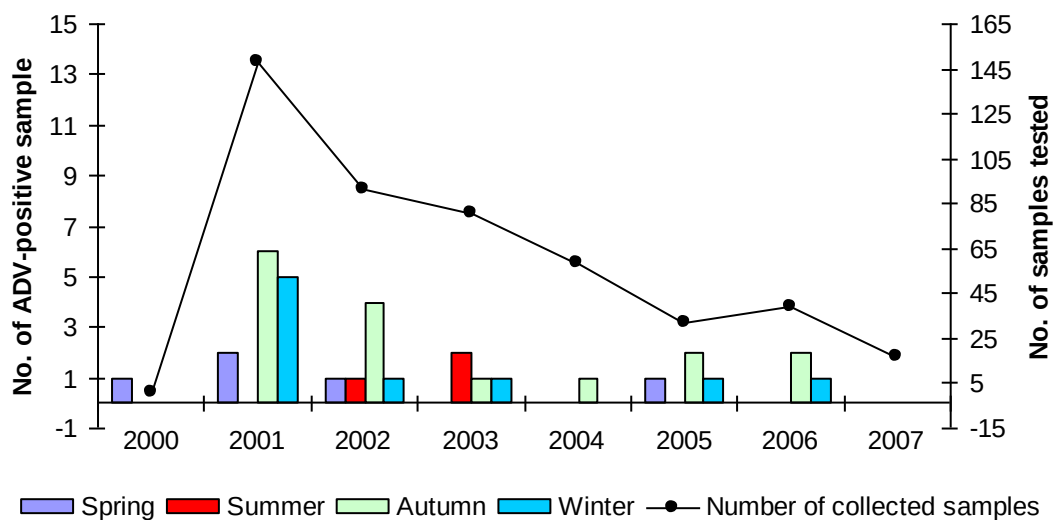


Fig. 1: Seasonal distribution of adenovirus-positive cases compared with the total number of collected samples during the study period.

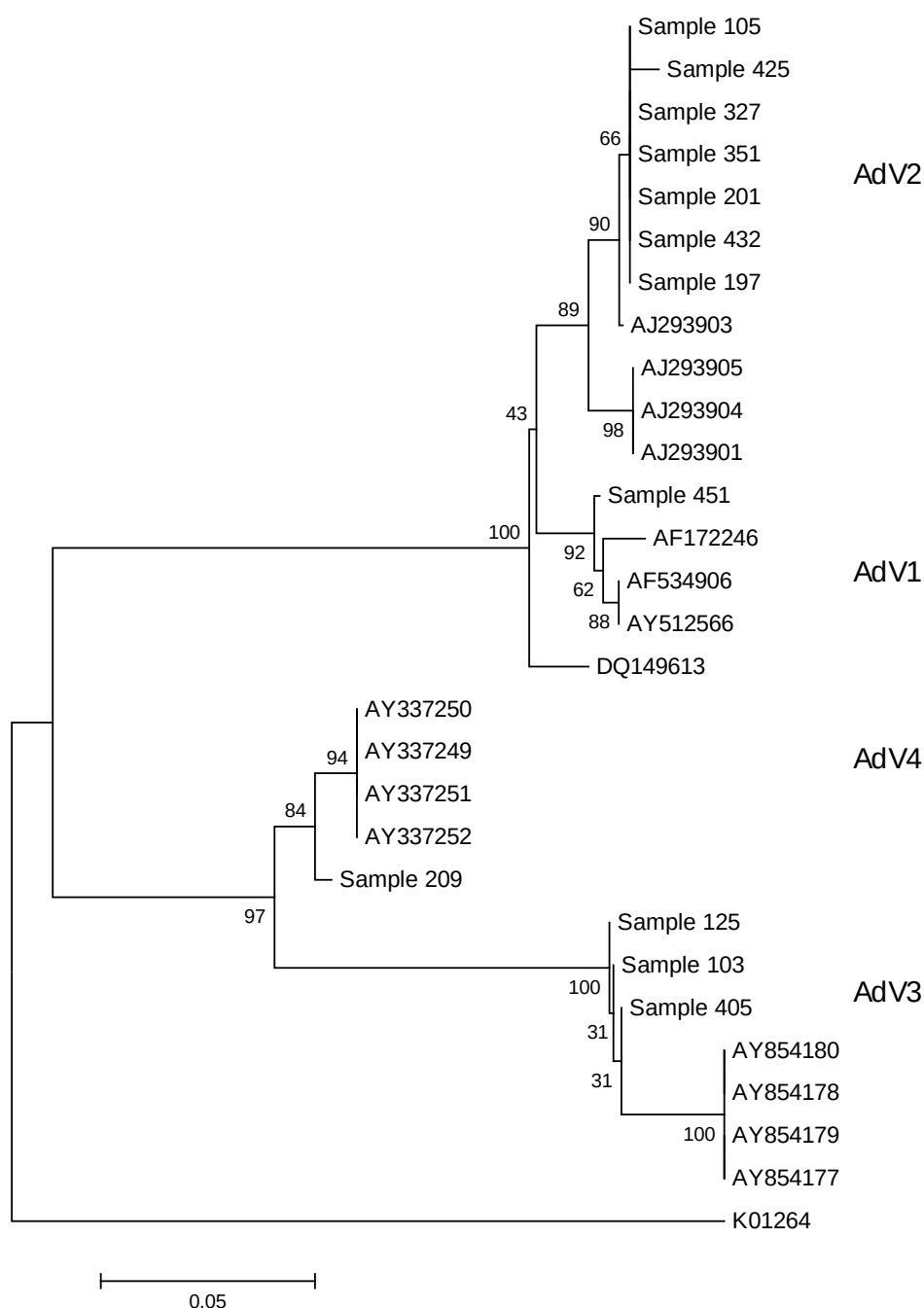


Fig. 2: Phylogenetic tree referring to partial nucleotide sequences of the adenovirus hexon gene built with the program MEGA 3.1 by neighbor-joining method. Bootstrap values (from 1000 replicates) are indicated as a percentage in each node. The following published sequences were used: AdV1 (Accession numbers: AF 534906, AY 512566, AF 172246, DQ 149613), AdV2 (Accession numbers: AJ 293903, AJ293901, AJ 293905, AJ 293904), AdV3 (Accession numbers: AY 854180, AY 854179, AY 854178, AY 854177), AdV 4 (Accession numbers: AY 337252, AY 337251, AY 337250, AY 337249) and for the outgroup (Accession number: KD 1264)

Annex A

**Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078****PARECER COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA N.º 0018/2000**

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRSH) a avaliação da resposta imune em crianças de 0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina ^a O. Queiroz

INSTITUIÇÃO: -UFU

MÉRITO:

De março de 2000 a agosto de 2001 espécimes clínicos serão coletados, de 2ª a 5ª feira, de cerca de 500 crianças de 0-2 anos de idade, atendidas no Hospital de Clínicas em Uberlândia-MG, provenientes da cidade e outras regiões urbanas e rurais da região, após o consentimento expresso dos pais e responsáveis.

PARECER:

O projeto não trará nenhum prejuízo para as pessoas envolvidas. Somos de parecer favorável à sua execução.

Uberlândia 14 de abril de 2000.


Prof. Humberto Eustáquio Coelho
Coordenador do CEP – UFU

Annex B

Universidade Federal de Uberlândia**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -

CEP -38400-089

☎(034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 24 de setembro de 2001.

Processo nº 018/2000- 2ª fase

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização Molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial humano (VRSH) e avaliação da resposta imune em crianças de –0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina aparecida Oliveira Queiroz

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.



Prof. Miguel Tanis Jorge
CEP/UFU

Annex C

Universidade Federal de Uberlândia
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA DE Nº
007/2003

Ilma. Sra.

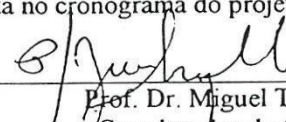
Uberlândia, 07 de fevereiro de 2003.

Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiroz

Prezada Professora,

Informamos-lhe, que o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, examinou e **APROVOU** sem restrição de ordem ética, o projeto de pesquisa "*Detecção de vírus respiratórios por reação de polimerização em cadeia (PCR) em secreções de nasofaringe de crianças de 0-5 anos de idade, residentes no Triângulo Mineiro*", cuja vigência será de julho de 2003 a junho de 2005, protocolado sob o número 018/2000 do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório final é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96/CNS.


 Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge
 Coordenador do CEP/UFU

IX.2 - Ao pesquisador cabe:

a) apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa;

b) desenvolver o projeto conforme delineado;

c) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

d) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento;

e) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP;

f) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto;

g) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Responsabilidades do Pesquisador:

a) Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma, reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III - RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

III.1 - Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III.2 - O pesquisador responsável deverá:

a - Apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - o projeto de pesquisa completo, nos termos da Resolução, 196/96 e desta Resolução.

b - Manter em arquivo, respeitando a confidencialidade e o sigilo as fichas correspondentes a cada sujeito incluído na pesquisa, por 5 anos, após o término da pesquisa.

c - Apresentar relatório detalhado sempre que solicitado ou estabelecido pelo CEP, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP ou pela Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS.

d - Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações adversas não esperadas.

e - Comunicar também propostas de eventuais modificações no projeto e ou justificativa de interrupção, aguardando a apreciação do CEP, exceto em caso urgente para salvaguardar a proteção dos sujeitos da pesquisa, devendo então ser comunicado o CEP a posteriori, na primeira oportunidade.

f - Colocar à disposição, do CEP, da CONEP e da SVS/MS toda informação devidamente requerida.

g - Proceder à análise contínua dos resultados, à medida que prossegue a pesquisa, com o objetivo de detectar o mais cedo possível benefícios de um tratamento sobre outro ou para evitar efeitos adversos em sujeitos de pesquisa.

h - Apresentar relatórios periódicos dentro de prazos estipulados pelo CEP havendo no mínimo, relatório semestral e relatório final.

i - Dar acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do paciente e ou ao próprio paciente sempre que solicitado e ou indicado

J - Recomendar que a mesma pessoa não seja sujeito de pesquisa em novo projeto antes de decorrido um ano de sua participação em pesquisa anterior, a menos que possa haver benefício direto ao sujeito da pesquisa.

Annex D



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

**ANÁLISE FINAL Nº 365/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
 REGISTRO CEP/UFU: 198/07**

Projeto Pesquisa: *“Caracterização molecular de vírus isolados de crianças com doença respiratória aguda, atendidas em Serviços de Saúde Pública de Uberlândia - MG”*

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiroz

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

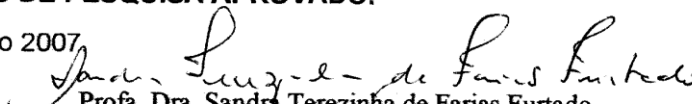
- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do **Relatório Parcial:** novembro/2008

Data para entrega do **Relatório Final:** dezembro/2009

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

Uberlândia, 28 de setembro 2007


 Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

Annex E

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, razão pela qual a equipe de Virologia da UFU vem desenvolvendo pesquisa nesse assunto.

A detecção do agente viral que está causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região.

É importante lembrar que a participação neste estudo é voluntária, que o nome de seu filho não será divulgado e que as amostras clínicas não serão utilizadas para nenhum outro estudo.

Se for do seu consentimento a coleta de secreção de nasofaringe (aspirado) e de 2-3mL de sangue de seu filho, favor assinar este documento.

Uberlândia: ____/____/____

Nome do pai/mãe ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos responsáveis: _____

Profs. Drs. Orlando César Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

Profa. Dra. Divina A. O. Queiróz

(34) 3218-2664

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU

(34) 3239-4131