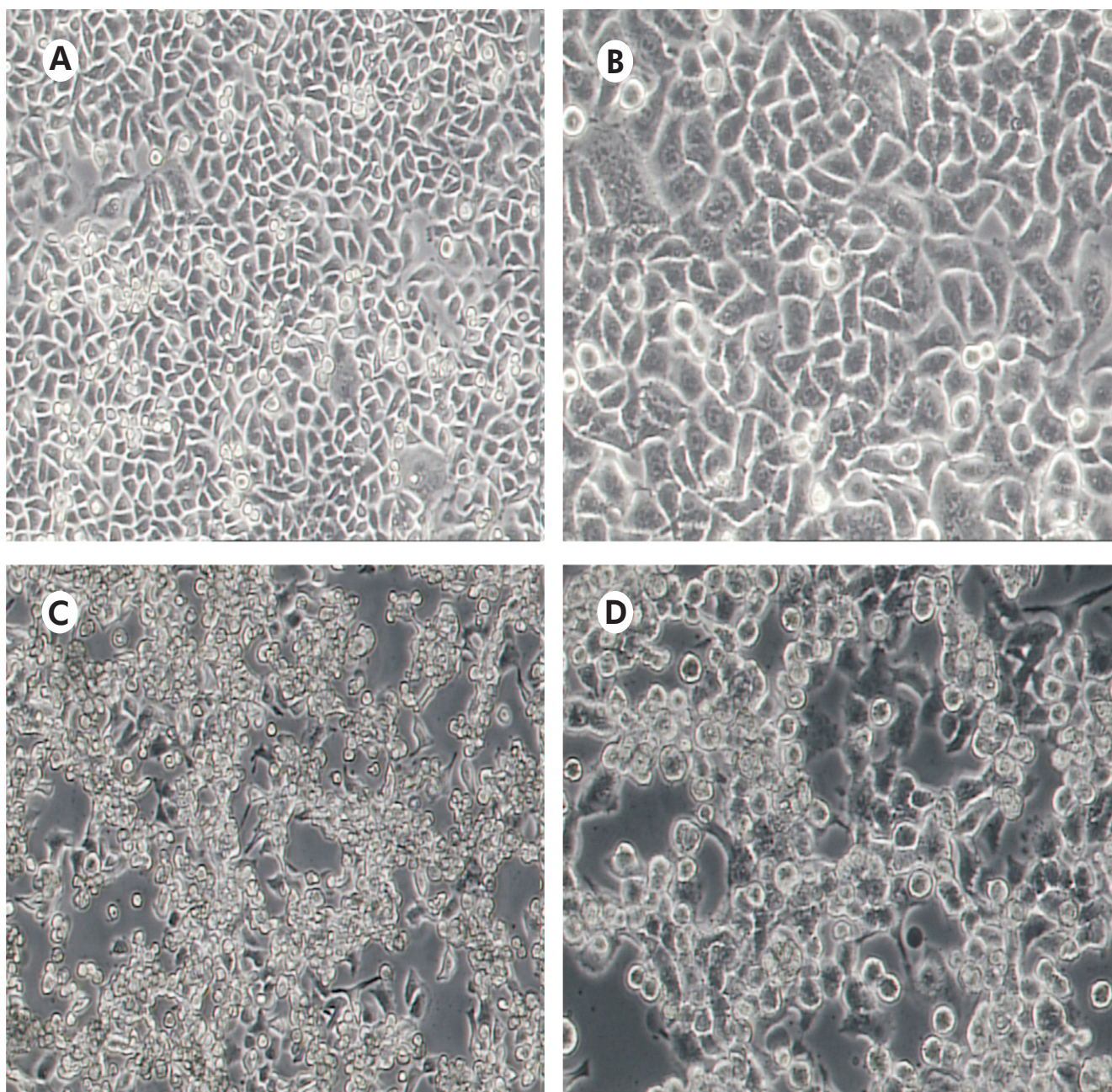


El producto de amplificación de la PCR fue analizado por electroforesis horizontal (120 voltios por 35 min) en gel de agarosa a 1%, utilizando tampón TBE 0,5X pH 8,4. Luego de la electroforesis, el gel fue teñido en solución de bromuro de etidio a 0,5 g/mL durante 30 min. La visualización de los *amplicons* se efectuó en transiluminador de ultravioleta y se fotografió en sistema de captura de imagen. Se utilizó como estándar de peso molecular el "ADN Ladder" de 123 pares de base (pb).

Todas las muestras de adenovirus no entérico (AdNE) se encaminaron para la vía clásica de identificación viral, o sea, la inoculación en células HEp-2¹⁵. Se realizó la inoculación de 0.2 mL de la muestra de suspensión fecal

en la proporción de 1:8, con AdNEs, en tubos de poliestireno con células HEp-2 en *monolayer*, mantenidas con 1 mL (en cada tubo) de Medio Mínimo de Mantenimiento, el que contenía solución de sales balanceadas (BSS), bicarbonato de sodio, sales de "Hanks", L-glutamina, aminoácidos no esenciales y esenciales, vitaminas, coenzimas, hormonas, ácidos nucleicos y derivados y 5% de suero bovino fetal.

Las células fueron mantenidas a 37° C en atmósfera húmeda y fueron observadas diariamente en microscopio óptico invertido, para visualizar el efecto citopatogénico (ECP). Como control negativo se utilizaron tubos no inoculados de HEp-2 del mismo pasaje (Figura 2).



Fuente: Sección de Virología del Instituto Evandro Chagas.

A y B: *Monolayer* normal de células HEp-2 en objetivas de 5x y 10x, respectivamente; **C y D:** Efecto citopatogénico de adenovirus no entérico. Se observa la formación de cachos entre las células, su redondeo y destacamento, en objetivas de 5x e 10x, respectivamente. Figuras observadas en microscopio óptico.

Figura 2 – Efecto citopatogénico

Ocorrência de adenovirus em crianças com gastroenterite aguda grave na Cidade de Belém, Pará, Brasil

RESUMO

As gastroenterites são uma das principais causas de doença infantil em todo mundo. Estudos epidemiológicos detectaram adenovirus em 2% a 22% dos casos de diarreia aguda infantil em hospitais e ambulatórios clínicos. Eles são responsáveis por 50% dos casos de intussuscepção intestinal pediátrica. O objetivo do estudo foi detectar a presença desses vírus nas amostras fecais de 380 crianças menores de 3 anos de idade, com quadro de gastroenterite, em Belém, Estado do Pará, Brasil, com ênfase no sorotipo 40/41. As amostras foram provenientes de um estudo de vigilância hospitalar e ambulatorial realizado pelo Instituto Evandro Chagas no período de março a setembro de 2003. Foram usadas as técnicas de EIA e imunocromatografia para triagem; e cultura de células e PCR para tipagem. Os adenovirus foram encontrados em 6,3% (24/380) das amostras. Já o adenovirus entérico (AdE) estava presente em 3,7% (14/380) das amostras testadas, equivalendo a 58,3% (14/24) dos casos positivos, o que demonstrou que esse vírus é causa de grande parte dos casos de gastroenterites em crianças. A técnica mais sensível foi a PCR, sendo capaz de definir sorotipos de cinco amostras que estavam sem definição. Os AdEs predominaram na faixa etária de 18-24 meses e o maior número de casos ocorreu no mês de março de 2003, com tempo de hospitalização de maior frequência em torno de seis dias. Os resultados obtidos neste estudo confirmam a circulação desse vírus na Cidade de Belém, demonstrando a importância deles como causa de gastroenterite em crianças.

Palavras-chave: Gastroenterite; Adenovirus Humanos; Reação em Cadeia da Polimerase.

Detection of adenoviruses in children with severe acute gastroenteritis in the City of Belém, Pará State, Brazil

ABSTRACT

Gastroenteritis is one of the major childhood diseases worldwide. Epidemiological studies have detected adenoviruses in 2% to 22% of cases of acute infantile diarrhea in hospitals and outpatient clinics. Adenoviruses are responsible for 50% of cases of pediatric intestinal intussusception. The aim of this study was to detect the presence of these viruses in stool samples from 380 children younger than 3 years old with symptoms of gastroenteritis in Belém, Pará State, Brazil, with an emphasis on serotype 40/41. The samples came from a surveillance study conducted by the hospital and outpatient clinic of the Instituto Evandro Chagas from March to September 2003. We used EIA and an immunochromatographic technique for screening, and cell culture and PCR for typing. Adenoviruses were found in 6.3% (24/380) of the samples. Enteric adenoviruses (EAdS) were present in 3.7% (14/380) of tested samples, which corresponded to 58.3% (14/24) of positive cases. This demonstrated that this virus is the cause of the majority cases of gastroenteritis in children. The most sensitive technique was PCR, which was able to define the serotypes of five samples that were not defined by other methods. EAdS predominated in the age group of 18-24 months, and the highest number of cases occurred in March 2003. The average time of hospitalization was approximately six days. The results of this study confirm the circulation of the virus in Belém, demonstrating the importance of adenoviruses as a cause of gastroenteritis in children.

Keywords: Gastroenteritis; Human Adenovirus; Polymerase Chain Reaction.



REFERENCIAS

- Bern C, Glass RI. Impact of diarrhoeal disease worldwide. In: Kapikian AZ, editor. Viral infection of gastrointestinal tract. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 1-26.
- Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. Fields Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. vol. 2, p. 1657-1708.
- Murray AC, Lopes AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet [Internet]. 1997 May [citado 2005 mar 15];349(9061):1269-76. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9142060&dopt=Citation.
- Secretaria Municipal de Saúde. Senso 2000. Belém: SESMA; 2005.
- Albert MJ. Enteric adenoviruses. Brief review. Arch. Virol. 1986;88(1-2):1-17.
- Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. N. Engl. J Med. 1991 Jul;325(4):252-64.
- Whitelaw A, Davies H, Parry J. Electron microscopy of fatal adenovirus gastroenteritis. Lancet. 1977 Feb;1(8007):361.
- Kotloff KL, Losonsky GA, Morris JG Jr, Wasserman SS, Singh-Naz N, Levine MM, et al. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. Pediatrics. 1989 Aug;84(2):219-25.

- 9 Falke D. *Virologia*. Tradução de Yehuda Levanon, revisão e adaptação de Elfried Kirchner. São Paulo: EPU, EDUSP; 1979. 189 p.
- 10 Ginelli A, Villas Boas C, Ribeiro LA. Intussuscepção [Internet]. [citado em 2005 abr 10]. Disponível em: <http://www.ctscan.com.br/casosclinicos/clinicamedica/intussuscepcao/index.php>.
- 11 Ferreira LM, Morais MAA, Costa IV, Linhares AC, Gabbay YB, Luz CRN. Detection of adenovirus type 40/41 in hospitalized children from São Luís, Maranhão. In: 15^o National Meeting of virology; 2004 Sep 26-29; São Paulo: [s.n]. 2004. (Virus Reviews & Research.).
- 12 Cepko CL, Whetstone CA, Sharp PA. Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. *J Clin Microb*. 1983 Feb;17(2):360-4.
- 13 Leclipteux T, Col D, Venuti M, Paulart F, Van Beers D, Foor M, et al. Comparison of immunochromatography with ELISA to detect Adenovirus in stools specimens. *New Insights in Gastrointestinal Diseases*. London (UK): [editor desconhecido]; 1998.
- 14 Pring-Akerblom P, Trijsenaar FE, Adrian T, Hoyer H. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. *J Med Virol*. 1999 May;58(1):87-92.
- 15 Bell JA, Huebner RJ, Rosen L, Rowe WP, Cole RM, Mastrotta FM, et al. Illness and microbial experiences of nursery children of Junior Village. *Am J Epidemiol*. 1961;74(3):267-92.
- 16 Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MCM, Silva FM, Carvalho TRB, Nozawa CM, et al. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol*. 2002;23(3):171-7.
- 17 He Y, Yang H. Typing of enteric adenoviruses in feces of infants with diarrhea. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2000;14(3):278-80.
- 18 Saderi H, Roustai MH, Sabahi F, Sadeghizadeh M, Owlia P, Jong JC. Incidence of enteric adenovirus gastroenteritis in Iranian children. *J Clin Virol*. 2002 Feb;24(1-2):1-5.
- 19 Oh Dy, Gadedickeg G, Schreier E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence molecular diversity. *J Med Virol*. 2003;71(1):82-93.
- 20 Aminu M, Ahmad AA, Umoh JU, Beer MC, Esona MD, Steele AD. Adenovirus infection in children with diarrhea disease in Northwestern Nigeria. *Ann Afr Med*. 2007 Dec;6(4):168-73.
- 21 Pereira EF, Assis RMS, Rocha M. Molecular characterization of human adenovirus associated with cases of infant gastroenteritis. In: 15 th National Meeting Virology; 2008 Sept 2004; São Paulo: [s.n]. 2004. p. 67. (Virus Reviews & Research; vol. 9; supl. 1).
- 22 Ferreira LM, Costa IV. Pesquisa de adenovírus entéricos e astrovírus em espécimes fecais de crianças diarreicas provenientes de São Luiz, Maranhão. 2004. (Monografia). Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Setor de Ciências da Saúde; 2004.
- 23 Bates PR, Baile AS, Wood DJ, Morrisid DJ, Couriel JM. Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus, and astrovirus gastroenteritis in children. *J Med Virol*. 1993 Mar;39(3):224-8.
- 24 Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Statallings EP, et al. Adenovirus and pediatric gastroenteritis. *J Infect Dis*. 1985 Mar;151(3):437-43.
- 25 Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol*. 1984 Sep;20(3):365-72.

Recibido en / Recebido em / Received: 22/3/2010
Aceito en / Aceito em / Accepted: 18/8/2010