

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE ADENOVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS FECAIS PROVENIENTES DE CRIANÇAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE.

SILVA, Vinicius Barreto¹; CARDOSO, Divina das Dôres de Paula²; Freitas, Érika Regina Leal³

Palavras-chave: gastroenterite, adenovírus, *MULTIPLEX - PCR*

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

As gastroenterites representam um dos principais problemas de saúde pública e causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento, sendo após as infecções respiratórias agudas, o mais importante motivo de morbidade e mortalidade infantil. Contribuem anualmente com 1,3 bilhão de casos, 18 milhões de hospitalizações e 1,4 milhões de óbitos de crianças menores de 5 anos, sendo que 80% dos óbitos ocorrem nos primeiros dois anos de vida, em que se destaca como principal causa a desidratação devido a diarreia. (Parashar *et al.*, 2003).

Vários vírus têm sido implicados na etiologia das gastroenterites, dentre eles os rotavírus, adenovírus, calicivírus humanos e astrovírus.

Dentre os vários agentes relacionados com a etiologia das gastroenterites, os adenovírus são responsáveis por grande número destas infecções. Assim, torna-se fundamental o conhecimento da identidade das amostras circulantes. Logo, neste contexto, a proposição do estudo é no sentido de determinar as espécies de adenovírus, circulantes na região Centro-Oeste, relacionados a infecções gastrointestinais sintomáticas ou não em crianças.

O presente trabalho teve como objetivos: Cultivar os adenovírus presentes nas suspensões fecais em culturas celulares, extrair o *dsDNA* viral a partir das suspensões fecais cultivadas em cultura celular, bem como das próprias suspensões fecais, confirmação das amostras detectadas como positivas por EIARA e determinação das espécies das amostras positivas de adenovírus humano através do *MULTIPLEX-PCR*.

2. METODOLOGIA

2.1 – Material de estudo.

O material de estudo foi constituído de 73 amostras fecais positivas para adenovírus humano, obtidas de crianças, as quais apresentavam ou não, quadro de diarreia aguda. Tais amostras foram colhidas nas cidades de Brasília – DF [Instituto de Saúde do Distrito Federal/Laboratório Central – SES-DF(ISDF/LACEN) e Universidade de Brasília (UNB)], Campo Grande – MS [Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)] e Goiânia –GO [Hospital Materno Infantil/SSGO e Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Goiás (UFG)] Durante o período de Abril de 1989 a Dezembro de 2003.

2.2 – Detecção de adenovírus humano.

A detecção de adenovírus foi feita através das suspensões fecais, previamente processadas a 20% em PBS, utilizando como metodologia o ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIARA).

2.3 – Cultivo de células.

Todas as amostras positivas para adenovírus por EIARA foram cultivadas em células HEp-2, com intuito de multiplicar o número de partículas virais presentes nas amostras positivas utilizadas no estudo. As culturas celulares foram mantidas em meio essencial mínimo, contendo 50 µg/mL de gentamicina e 0,5 µg/mL de anfotericina B, além de soro fetal bovino a 10%.

2.4 – Propagação viral.

As amostras fecais positivas para adenovírus pelo EIARA, bem como os protótipos, foram propagadas em garrafas com monocamadas 80% confluentes de HEp-2 e submetidas somente a uma passagem.

2.5 – Extração do *dsDNA* de adenovírus humano.

O *dsDNA* de adenovírus humano foi extraído a partir das suspensões fecais cultivadas em células HEp-2 pelo método de sílica, utilizando o isotiocianato de guanidina como descrito por Boom *et al.* (1990) com algumas modificações, bem como os protótipos dos sorotipos 5 (espécie c),

31 (espécie A), 9 (espécie D) e 3 (espécie B). Tal procedimento também foi realizado diretamente para as suspensões fecais a 20% que apresentaram alíquota suficiente de material para análise.

2.6 – MULTIPLEX – PCR

A determinação das espécies nas amostras positivas de adenovírus humano foi realizada através de *MULTIPLEX-PCR*, para o qual foram utilizados os iniciadores HsgA1-F1 e HsgA2-F2, que são de região bastante conservada do *hexon*. Os iniciadores, bem como a metodologia adotada, seguiram preconização conforme Pring-Akerblom *et al.* (1999).

A reação de *MULTIPLEX-PCR* foi realizada para todas as amostras submetidas a propagação viral em cultura celular. Para confirmação, a presente reação também foi realizada para as suspensões fecais de todas as amostras que dispunham de material suficiente para análise.

2.7 – Visualização do produto de amplificação.

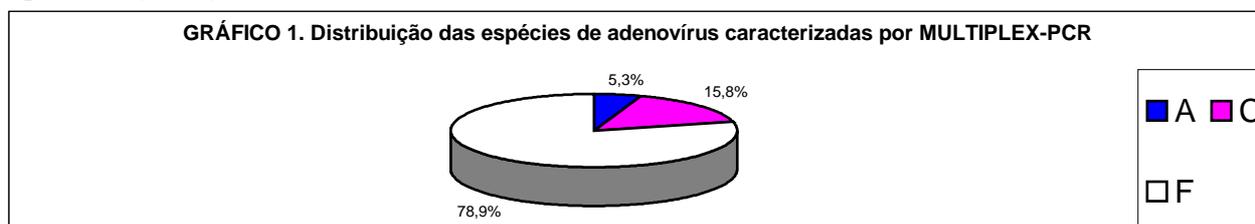
Após a reação da *PCR*, 15 µL do produto da reação foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,25 µg/L) e submetido a uma corrida eletroforética por 2 a 3 horas a 40 mA em TBE 1X (0,089M Tris; 0,089M ácido bórico e 0,002M EDTA). O produto foi visualizado em transluminador UV.

2.8 – PCR espécie específica.

O protocolo para *PCR* espécie específica é muito semelhante ao utilizado para *MULTIPLEX – PCR*, diferenciando apenas na etapa de adição dos iniciadores. No *MULTIPLEX – PCR* é adicionado um *pool* de primers para cada reação, já no *PCR* espécie específico cada iniciador específico de uma espécie é usado isoladamente para cada reação. Tal procedimento foi realizado apenas para confirmação das amostras positivas na *MULTIPLEX-PCR*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 73 amostras analisadas, 38 (52,1%) apresentaram positividade para *MULTIPLEX-PCR*, das quais, de acordo com o Gráfico 1, 30 (78%) pertencem a espécie F, 6 a espécie C (15,8%) e 2 a espécie A (5,3%).



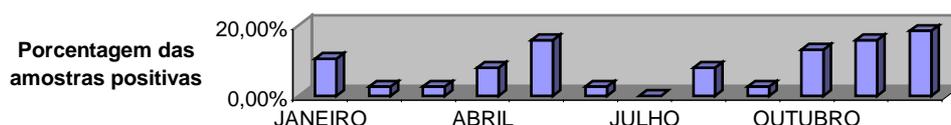
Das amostras coletadas em Goiânia, 27 apresentaram positividade para *MULTIPLEX-PCR*, correspondendo a 71,1% das amostras positivas. Com relação às amostras coletadas em Brasília, apenas 1 (2,6 %) amostra foi positiva para *MULTIPLEX-PCR*. Já das amostras procedentes de Campo Grande, 10 foram positivas para *MULTIPLEX-PCR*, correspondendo a 26,3% do total de amostras positivas.

Local de coleta	Nº (%) de amostras positivas de acordo com as espécies de adenovírus			Nº (%) de amostras positivas	Nº de amostras testadas
	A	C	F		
Goiânia	2 (7,4)	2 (7,4)	23 (85,2)	27 (71,1)	52
Brasília	0	0	1 (100)	1 (2,6)	6
C. Grande	0	4 (40)	6 (60)	10 (26,3)	15
Total	2 (5,3)	6 (15,8)	30 (78,9)	38 (100)	73

Em Goiânia, houve circulação das espécies A, C e E. Já em Campo Grande houve ocorrência das espécies C e F. Em Brasília, ocorreu apenas a caracterização de adenovírus entérico, porém apenas 6 amostras provenientes de Brasília foram analisadas e 1 foi positiva.

Com relação a sazonalidade das amostras analisadas por *MULTIPLEX-PCR* os resultados encontram-se em conformidade com os dados apresentados por Li *et al*, em 2004, na Ásia. Sendo assim, as maiores porcentagens de adenovírus foram encontradas nos meses mais úmidos (chuvosos), como em Outubro, Novembro, Dezembro e Janeiro. O mês de maio também apresentou uma alta porcentagem de positividade para adenovírus, correspondendo a um mês de transição entre os meses de seca e os meses de chuva.

GRÁFICO 2. Distribuição das amostras identificadas como positivas para adenovírus por MULTIPLEX-PCR, de acordo com a data de coleta.



Os adenovírus entéricos são considerados vírus fastidiosos, ou seja, vírus difíceis de serem isolados de culturas celulares usadas rotineiramente (Kidd *et al.*, 1981). Neste estudo, foram utilizadas células de linhagem contínua HEp-2. Contudo, apenas 3 amostras foram positivas para as suspensões fecais e negativas para as suspensões pós-cultivo celular, confirmando que os adenovírus apesar de serem considerados vírus difíceis de serem isolados podem o ser em culturas celulares HEp-2.

Diferentes procedimentos podem ser utilizados para detecção de adenovírus a partir de espécimes clínicos bem como a partir de cultivos celulares (Pereira *et al.*, 1985). Neste estudo, foi utilizado *MULTIPLEX – PCR*, conforme preconizado por Pring-Akerblom *et al.* (1999). A *MULTIPLEX – PCR* mostrou-se um procedimento rápido, simples, de fácil execução, mas algumas amostras geraram dúvidas quanto a sua classificação. Dessa forma, foi realizada a PCR espécie específica, com a adição de apenas um par de iniciadores específico para cada espécie em cada reação. Logo, todas as amostras positivas puderam ser enquadradas em suas respectivas espécies.

4. CONCLUSÃO

Das 73 amostras submetidas a *MULTIPLEX – PCR*, 35 amostras foram consideradas negativas. Uma vez que todas as amostras foram previamente diagnosticadas como positivas para adenovírus pelo método de EIARA, podemos dizer que métodos diferentes podem gerar resultados diferentes, daí a importância da adoção de mais de um método para detecção, caracterização e validação dos resultados para adenovírus.

Considerando a etapa de cultivo celular, não foram todas as amostras que apresentaram efeito citopático, o que pode confirmar a dificuldade de isolar adenovírus entéricos de culturas celulares. Apesar das dificuldades de isolamento de tais vírus, podemos evidenciar que a cultura de células HEp-2 constitui-se num ótimo meio para isolamento dos adenovírus entéricos.

Verificou-se, também, a prevalência da espécie F nas amostras caracterizadas, espécie na qual estão classificados os sorotipos 40 e 41 que correspondem aos adenovírus entéricos. Mas, não descartando a importância dos adenovírus não entéricos na etiologia das gastroenterites virais, principalmente representados pelas espécies A e C, neste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KIDD, A.H.; MADELEY, C.R. *In vitro* growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *J. Clin. Pathol.* **1981**; **34**:213-216.
- LI, L.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; KIM, K.S.; SEO, J.K.; SHIMIZU, H.; SUZUKI, E.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular Epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol. Immunol.*, **49**(2). 121-128, 2004.
- PARASHAR, U.D; HUMMELMAN, E.G; BRESEE, J.S; MILLER, M.A; GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging infections diseases*, **9**(5): 565-572, 2003.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P.; CASTRO, L.A. Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Methods*, **10**: 21-28, 1985.
- PRING-AKERBLOM, P.; TRIJSSENAAR, F.E.; ADRIAN, T.; HOYER, H. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Subgenus-Specific Detection of Human Adenoviruses in Clinical Samples. *Journal of Medical Virology.*, **58**: 87-92, 1999.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Faculdade de Farmácia e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, Laboratório de Virologia Humana. Viniciusbarreto11@yahoo.com.br

² Orientadora/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, Laboratório de Virologia Humana. dcardoso@iptsp.ufg.br

³ Bolsista de mestrado/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, Laboratório de Virologia Humana. Erika.Regina@ibest.com.br