

Detecção e caracterização de adenovírus humano proveniente de casos de paralisia flácida aguda, na Região Norte do Brasil

Detection and characterization of human adenoviruses from cases of acute flaccid paralysis in Northern Brazil

Detección y caracterización de adenovirus humano proveniente de casos de parálisis flácida aguda, en la Región Norte de Brasil

Jessylene de Almeida Ferreira
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Fernando Neto Tavares
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Mirleide Cordeiro dos Santos
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Maria de Lourdes Contente Gomes
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Edivaldo Costa Sousa Júnior
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Alexandre da Costa Linhares
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Jainara Cristina dos Santos Alves
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Ana Lucia Monteiro Wanzeller
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMO

Os adenovírus humanos (HAdV) causam uma variedade de infecções, tais como as respiratórias agudas, gastrointestinais, oculares, do trato urinário e ainda síndromes neurológicas graves. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar HAdV em amostras de fezes provenientes de pacientes oriundos da Região Norte do Brasil, no período de 1998 a 2012, com quadro de paralisia flácida aguda, negativas para poliovírus e enterovírus não pólio. No estudo, 19 amostras apresentaram efeito citopático característico de HAdV quando inoculadas nas linhagens HEp2-C e L20B. Essas amostras foram submetidas à reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) e sequenciamento nucleotídico parcial do gene que codifica a proteína héxon. Do total de amostras, 13 foram confirmadas por qPCR, PCR e sequenciamento nucleotídico. A análise genética demonstrou a seguinte caracterização viral: uma amostra como HAdV-F41; três como HAdV-A31 e nove da espécie C, sendo três HAdV-C5 e seis HAdV-C6. As amostras positivas foram provenientes dos Estados do Pará (6/19 – 31,6%), Amazonas (6/19 – 31,6%) e Acre (1/19 – 5,2%). Quanto à faixa etária, dos 13 casos positivos, 12 eram de crianças menores de 5 anos de idade, representando 92,3% dos casos. Os resultados encontrados sugerem uma possível participação dos HAdV na etiologia dos casos de paralisia flácida aguda ocorridos na Região Norte do Brasil.

Palavras-chave: Adenovírus Humano; Paralisia Flácida Aguda; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Técnicas de Cultura de Células.

INTRODUÇÃO

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, que contém sete espécies diferentes (A a G), constituídas por 67 tipos^{1,2,3,4}.

Em virtude da emergência de novas tecnologias de biologia molecular, a revelação de novos vírus tem sido comumente relatada e, recentemente, foi sugerido um novo tipo de adenovírus – tipo 68 da espécie B. Os 51 tipos pré-existentes de adenovírus foram identificados por métodos sorológicos tradicionais, levando em consideração a composição viral e a patogenicidade, diferentemente dos tipos 52 a 68 que foram identificados por meio do sequenciamento genômico e análises de bioinformática⁵.

Os adenovírus humanos (HAdV) são vírus não envelopados de 90 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, com genoma de ADN de fita dupla,

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Jessylene de Almeida Ferreira
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia, Laboratório de Vírus Respiratórios
Rodovia BR-316, km 7, s/n. Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: (91) 3214-2024
E-mail: jessyleneferreira@iec.pa.gov.br / jessylene_almeida@hotmail.com

contendo em média 36 Kb. O vírion é constituído de 11 proteínas (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP); sete das quais estão no capsídeo (II, III, IIIa, IV, VI, VIII e IX), que é composto por 252 subunidades de capsômeros. Destas, 240 são constituídas pela proteína héxon (pII) – as quais compõem as faces do icosaedro – e as demais (12 capsômeros) são compostas pelas proteínas penton-base (pIII) e fibra (pIV) que juntas compõem o vértice viral¹.

Nos HAdV, destaca-se como determinante viral de infecção, a região globular carboxi-terminal (C-terminal) da fibra que é a responsável pelo reconhecimento do receptor primário, adsorvendo a partícula viral à célula. Enquanto que os receptores celulares são importantes determinantes de infecção do hospedeiro, e no caso dos HAdV o principal é denominado de CAR (receptor para adenovírus e coxsackievírus)⁶. A fibra viral desempenha uma importante função na infecção celular e esse fato é demonstrado quando a infecção, com partículas virais sem fibras, fica profundamente comprometida, desse modo, a boa interação entre a região globular da fibra e o receptor celular é de extrema importância para o sucesso da infecção viral^{7,8,9}.

A capacidade que o vírus tem de infectar seletivamente um subconjunto determinado de células, denominado histotropismo viral, é influenciado pelos receptores celulares reconhecidos pela fibra e pelo penton. Logo, é de se esperar que os adenovírus não apresentem tropismo definido, visto que seu receptor principal é expresso em quase todas as células epiteliais¹⁰. Portanto, a patogenia dos HAdV variam de acordo com a espécie, embora possam causar infecções assintomáticas, também podem levar diferentes quadros clínicos que incluem infecções respiratórias, gastrointestinais, urinárias e oculares, além de serem vírus com capacidade de permanecerem latentes no hospedeiro humano. A duração de excreção viral no início dos sintomas é de uma semana em infecções respiratórias e de duas semanas em infecções oculares, assim como na urina e nas fezes^{11,12}.

Recentes investigações têm demonstrado que os HAdV podem estar implicados na gênese de infecções do sistema nervoso central (SNC), tal como, meningoencefalite, encefalite e paralisia flácida aguda (PFA)^{13,14,15,16,17,18}.

O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar os adenovírus em casos de PFA, os quais eram negativos para poliovírus e enterovírus não pólio.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

A amostra fecal foi o material clínico utilizado no presente estudo por ser considerado o espécime de escolha para pesquisa de agentes entéricos como o adenovírus. Essas amostras pertenciam ao Programa da Rede de Vigilância Nacional para PFA, recebidas no Laboratório de Enterovírus do Instituto Evandro Chagas (IEC), e que foram negativas para poliovírus e enterovírus

não pólio no período de 1998 a 2012. O estudo foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IEC, nº 0027/2008, aprovado em 29 de abril de 2009.

PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS

As suspensões das amostras fecais foram preparadas de acordo com a metodologia descrita no *Polio Laboratory Manual* (World Health Organization – WHO)¹⁹. Para o procedimento foram adicionados 10 mL de PBS (tampão fosfato salino – phosphate-buffered saline) suplementado com penicilina e estreptomicina, 1 g de pérolas de vidro de aproximadamente 3 mm de diâmetro e 1 mL de clorofórmio em tubo de polietileno. Em seguida, foram transferidas aproximadamente 2 g de cada amostra fecal para o tubo correspondente, com movimentação vigorosa por 20 min usando um agitador mecânico, centrifugando-se por 20 min a 1.500 g em centrífuga refrigerada a 8° C. O sobrenadante foi armazenado a -20° C para uso posterior.

PROPAGAÇÃO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS

As amostras foram submetidas ao cultivo em células HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana) e L20-B (células de camundongo que expressam receptor para poliovírus). Esses cultivos foram mantidos em garrafas plásticas contendo MEM (*minimum essential medium*) com sais de Eagle, acrescido de bicarbonato de sódio na concentração de 1,5 g/L, soro bovino fetal 10%, L-glutamina 4 mM, HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanessulfônico) 10 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

Para a inoculação, inicialmente a monocamada foi lavada duas vezes com 2 mL de solução de PBS e foram adicionados 500 µL da suspensão fecal, e mantido para adsorção por 30 min na estufa a 37° C. Após a adsorção, adicionaram-se 7,5 mL de MEM a 2% de soro bovino fetal.

As garrafas foram observadas ao microscópio ótico invertido de sete a nove dias para visualização do efeito citopático (ECP). As amostras que apresentaram ECP foram usadas para testes de biologia molecular. As negativas foram congeladas e descongeladas e submetidas a uma nova inoculação (passagem), sendo realizado, no máximo, até três passagens.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A extração do DNA viral foi realizada a partir do vírus isolado em cultura, utilizando do *kit* QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha) disponível comercialmente, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Após a extração, as amostras foram submetidas à reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) utilizando iniciadores e sondas específicos para os adenovírus²⁰. Para as amostras positivas na qPCR, foi realizada uma nova PCR, tal como descrito na literatura²¹, contudo, utilizando iniciadores universais Ad1 (TTCCCCATGGCICAYAACAC) e Ad2 (CCCTGGTAKCCCRATRTTGTA)²² que amplificam um fragmento de 482 pb de uma região do gene héxon conservada entre todos os tipos humanos reconhecidos.

As amostras positivas na PCR foram purificadas pelo kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, e então sequenciadas pelo método de Sanger²³, segundo o fabricante do kit BigDye® Terminator (Applied Biosystems, EUA). O produto dessa reação foi precipitado com isopropanol e ressuspenso em formamida, seguido de eletroforese em sequenciador automático (ABI PRISM 3130 xl, Applied Biosystems, EUA).

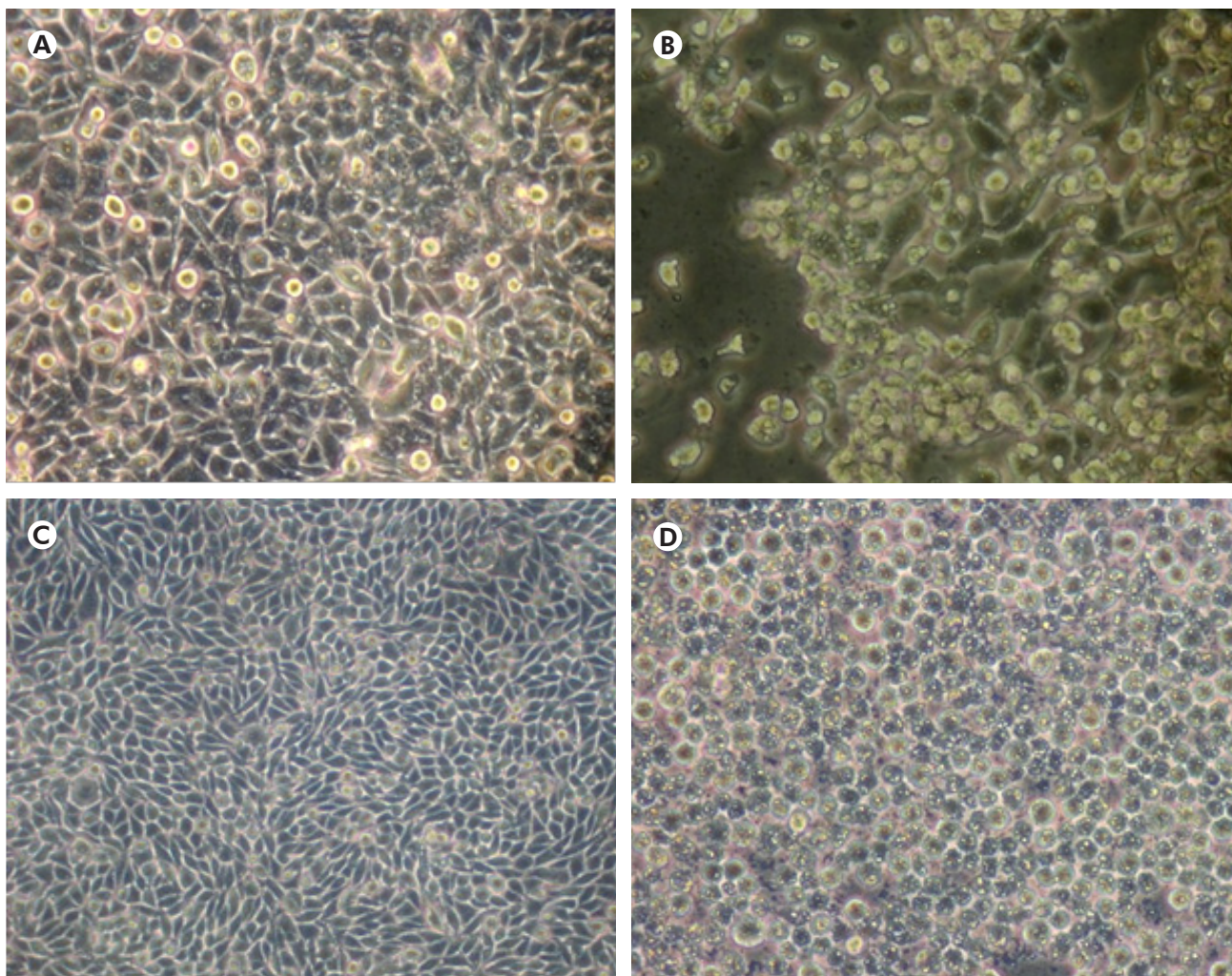
As sequências nucleotídicas foram editadas e analisadas utilizando-se o programa Geneious Pro (Biometters, Nova Zelândia). Posteriormente foram comparadas com as sequências contidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), usando o programa Blast, para determinação do tipo e confirmação da identidade viral. O programa jModeltest 2.0²⁴ define o modelo mais adequado de substituição nucleotídica empregado para as sequências, de acordo com o critério de informação Akaike (CIA). Para a construção da árvore filogenética foi realizado o método de máxima verossimilhança (*maximum likelihood* - ML), usando o programa RAxML²⁵.

RESULTADOS

Levando em consideração os critérios de estudo, 19 amostras foram positivas em HEp-2 e L20-B, com ECP compatível com o isolamento dos adenovírus, caracterizado por células aglomeradas que lembram a formação de "cachos", ocorrendo em seguida a contração da camada celular, provocando a dissociação da superfície da cultura deixando as células soltas no sobrenadante (Figura 1).

Dos 19 isolamentos, 13 (68,4%) foram confirmados por qPCR. Os outros seis foram negativos para HAdV em qPCR e PCR; desse modo, as amostras foram consideradas como não tipadas. Dados do sequenciamento estão dispostos na figura 2 e tabela 1.

Considerando a positividade das amostras, 6/13 (46,2%) são oriundas do Estado do Amazonas, 6/13 (46,2%) do Estado do Pará e 1/13 (7,6%) do Acre, não havendo positividade nos outros Estados da região. Com relação à faixa etária, dos 13 casos positivos, 12 são de crianças menores de 5 anos de idade, representando 92,3% dos casos. E quanto ao sexo, oito casos (61,5%) correspondem ao masculino e cinco ao feminino (38,5%). Todos esses dados estão demonstrados na tabela 1.



A: Controle negativo em células HEp-2; **B:** Cultura celular infectada após 24 h de inoculação em células HEp-2; **C:** Controle negativo em células L20B; **D:** Cultura celular infectada após 24 h de inoculação em células L20B.

Figura 1 – Efeito citopático semelhante ao causado por adenovírus em células HEp-2 (Figuras A e B) e L20B (Figuras C e D) obtidos por microscopia óptica de inversão 20x

Tabela 1 – Características epidemiológicas dos 13 casos de PFA positivos para adenovírus

| | | N | % |
|----------------|-----------|----|------|
| Idade | ≤ 5 | 12 | 92,3 |
| | ≥ 6 | 1 | 7,7 |
| Sexo | Feminino | 5 | 38,5 |
| | Masculino | 8 | 61,5 |
| Local | Acre | 1 | 7,6 |
| | Amazonas | 6 | 42,2 |
| | Pará | 6 | 46,2 |
| Sequenciamento | HAdV-A | 3 | 23,1 |
| | HAdV-C | 9 | 69,2 |
| | HAdV-F | 1 | 7,7 |

DISCUSSÃO

Após a erradicação do poliovírus selvagem no Brasil, a participação de outros agentes virais tais como os adenovírus, com capacidade de causar doença no SNC, tornou-se mais aparente^{26,27}. No presente estudo foram isolados 13 HAdV das amostras de pacientes com PFA.

Achados semelhantes foram detectados na Finlândia durante a vigilância de pacientes com PFA, onde se detectaram quatro HAdV provenientes de amostras negativas para poliovírus e enterovírus²⁸. Na China, em 5,7% das amostras isoladas a partir de casos de PFA, foi identificado o adenovírus²⁹.

Em concordância com resultados anteriormente descritos em 1997, na Malásia, adenovírus da espécie B foram isolados de crianças com PFA que chegaram a óbito durante uma epidemia da doença mão-pé-boca¹³.

No período de 1997 a 2002 foram pesquisados casos de PFA que ocorreram no Brasil, Peru e Bolívia, isolando-se os HAdV a partir de espécimes fecais de casos suspeitos de PFA, sendo identificadas as seguintes espécies: A (três isolamentos), B (20 isolamentos), C (38 isolamentos), D (dois isolamentos) e E (um isolamento), atribuindo-se aos adenovírus da espécie B (31,3%) o possível envolvimento como agente etiológico da PFA¹⁷.

Diferentemente dos achados anteriormente referidos, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os adenovírus da espécie C foram mais frequentemente encontrados nos casos de PFA, seguidos das espécies A e E. Tais espécies possuem tropismo pelo trato gastrointestinal, provocando gastroenterites e podendo ser isolados naturalmente das fezes^{11,12}. O seu papel para doença degenerativa não foi considerado no presente estudo, uma vez que foi utilizada suspensão fecal para o isolamento viral. Desse modo, foram considerados apenas os adenovírus da espécie C.

De acordo com Wold e Ison¹, é incomum isolar qualquer um dos tipos de adenovírus do líquido cefarrolíquidiano (LCR) ou do cérebro, contudo, estudos têm demonstrado o isolamento de HAdV (HAdV- 3, 5, 6, 7, 7A e 12) de LCR em pacientes

com meningoencefalite. Nesse sentido, os mesmos autores afirmam que HAdV-C5 foi cultivado do LCR de dois pacientes imunocompetentes, sendo que um apresentava meningoencefalite e o outro meningite.

Por outro lado, no estudo de Ory et al³⁰, considera-se a hipótese de que a infecção viral por HAdV no SNC, como a meningite, pode ser ocasionada por uma complicação secundária à pneumonia. No mesmo estudo, foi identificado HAdV-5 em um caso de cerebelite, com um histórico de conjuntivite, e outro de meningite.

Certamente ainda é preliminar a afirmação de que os adenovírus possam ser um dos agentes etiológicos de PFA, pois ainda faltam investigações e dados que demonstrem o possível mecanismo viral para dada infecção. Além disso, uma das limitações do presente estudo é que há a necessidade paralela de um grupo controle (pacientes sem PFA), com a finalidade de se comparar e verificar em qual grupo (pacientes com PFA e sem PFA) os adenovírus seriam mais prevalentes.

Além disso, é pertinente relatar que novos HAdV têm sido originados por recombinação de no mínimo dois vírus. Tal como ocorreu com o HAdV-58, recentemente caracterizado como um novo adenovírus com genes da fibra e do héxon do HAdV-25 e HAdV-29³¹. Matsushima et al^{2,3} têm sugerido que, para fins de identificação e classificação viral se realize o sequenciamento nucleotídico completo dos genes da fibra, penton base e héxon, pois de acordo com os autores, as regiões conservadas destes três genes têm apresentado papel importante na recombinação. Frente a essa nova proposta, a investigação destes genes nos HAdV encontrados no presente estudo, seria muito interessante para investigação de uma possível recombinação, assim como para a maior fidedignidade quanto ao tipo viral. Em relação a isso, o sequenciamento parcial ofereceu um norte quanto à identificação no presente estudo, levando em consideração que os tipos encontrados variaram de 95% a 100% de similaridade em relação à sequência protótipo (Figura 2). No entanto, a proposta de Matsushima et al^{2,3} é muito relevante.

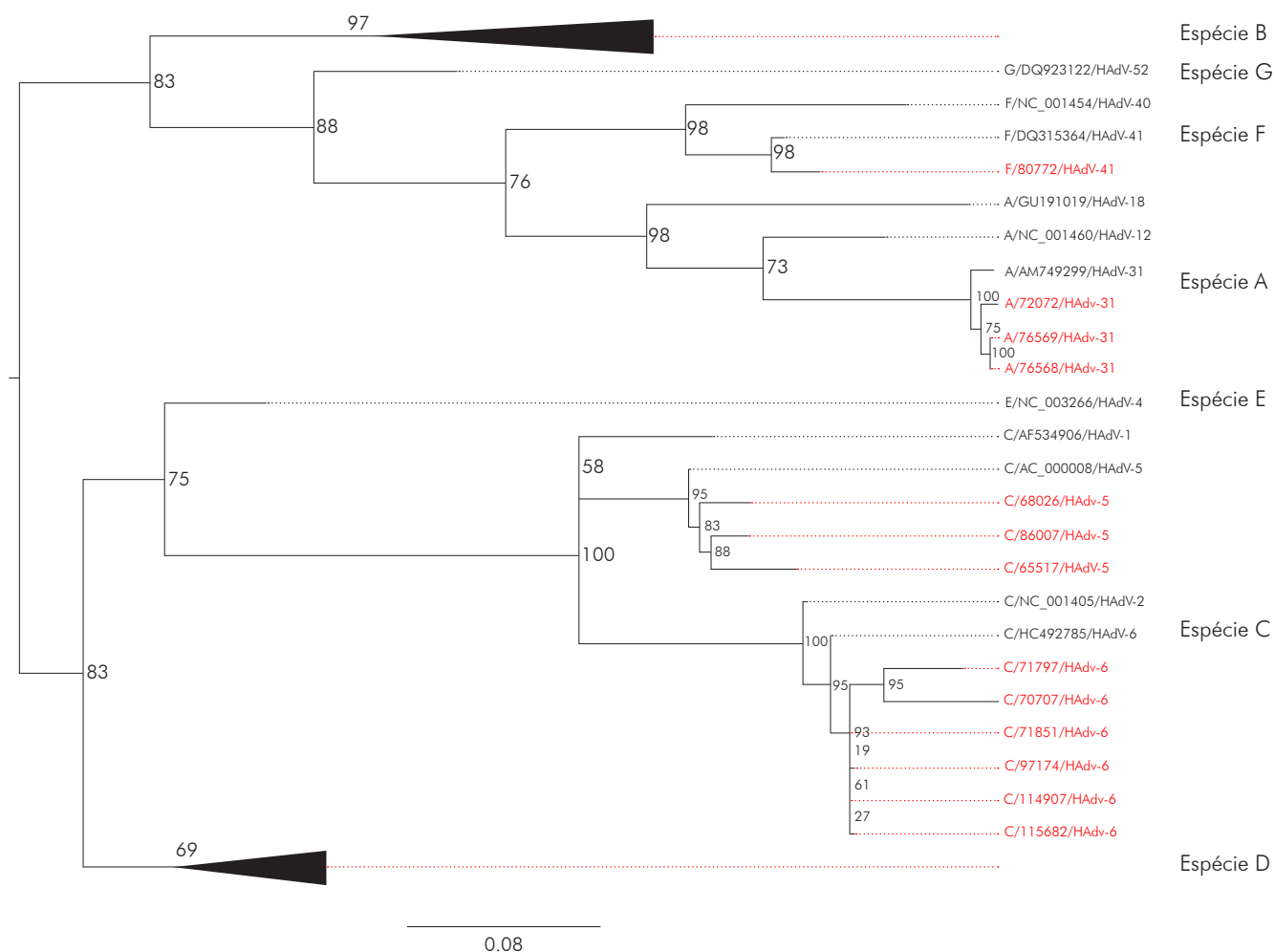


Figura 2 – Árvore filogenética da sequência parcial do gene codificador da proteína héxon dos adenovírus humanos. As amostras do presente estudo estão destacadas em vermelho

Outro fator importante é o conhecimento das bases moleculares do vírus que colaboram para o tropismo tecidual, tal como da região E3 da fibra viral^{32,33}. E levando em consideração que a PFA é uma doença que causa deficiência motora flácida, devido à destruição dos neurônios do córtex motor, a possível replicação dos HAdV em neurônios motores deve ser amplamente investigada para a melhor compreensão do histotropismo dos HAdV associados à PFA.

De acordo com Roy et al³⁴, os adenovírus podem fazer parte da flora normal do intestino, pois foi identificado em linfócitos e tecido intestinal de pessoas assintomáticas o DNA de vários tipos de adenovírus, verificando HAdV-C (tipos 7 e 1). Por isso, também se faz necessário a investigação em outros espécimes clínicos tais como LCR e soro.

Contudo, é admissível o envolvimento de outros agentes virais com a capacidade de invadir e replicar em células do SNC e causar PFA, principalmente nas regiões onde o poliovírus foi erradicado. Somando-se a isso, a positividade obtida no presente estudo de 68,4% para os HAdV em amostras negativas para poliovírus e

enterovírus não pólio (principais agentes da infecção) foi aparentemente expressiva.

Nossos resultados, combinados com a existência de pesquisas sobre a participação de adenovírus em doenças que envolvem o SNC, sugerem que estes vírus possam estar envolvidos na etiologia dos casos de PFA. No entanto, outras investigações devidamente controladas sobre essa possível associação devem ser realizadas.

CONCLUSÃO

Diferentemente dos demais estudos, no presente, os adenovírus da espécie C foram identificados com mais frequência aos casos de PFA. A positividade obtida no presente estudo foi de 68,4% para os HAdV. Mais estudos devem ser realizados pra verificar a possível associação de outros agentes virais, tais como o adenovírus, na participação da etiologia de casos de PFA.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa teve o suporte financeiro do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Evandro Chagas e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.



Detection and characterization of human adenoviruses from cases of acute flaccid paralysis in Northern Brazil

ABSTRACT

The human adenovirus (HAdV) cause a variety of infections such as acute respiratory, gastrointestinal, ocular, urinary tract and also serious neurological syndromes. The present study aimed to identify and characterize HAdV in stool samples of patients from the Northern region of Brazil in the period of 1998 to 2012, with acute flaccid paralysis, negative for poliovirus and enterovirus nonpolio. In this study, 19 samples showed a characteristic cytopathic effect of HAdV when inoculated in HEp2-C and L20B lineages. These samples were subjected by the polymerase chain reaction (PCR) in real-time (qPCR) and partial nucleotide sequencing of the hexon gene. Of the total samples, 13 were confirmed by qPCR, PCR and nucleotide sequencing. Genetic analysis showed the following viral characterization: one sample of HAdV-F41; three samples of HAdV-A31 and nine species C, three of HAdV-C5-C6 and six of HAdV. The positive samples were from the States of Pará (6/19 – 31.6%), Amazonas (6/19 – 31.6%) and Acre (1/19 – 5.2%). In relation to the age group, from 13 positive cases, 12 were children under 5 years old, representing 92.3% of cases. The results suggest a possible HAdV participation in the etiology of acute flaccid paralysis occurred in Northern Brazil.

Keywords: Adenoviruses, Human; Acute Flaccid Paralysis; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Cell Culture Techniques.

Detecção y caracterización de adenovirus humano proveniente de casos de parálisis flácida aguda, en la Región Norte de Brasil

RESUMEN

Los adenovirus humanos (HAdV) causan una variedad de infecciones, tales como las respiratorias agudas, gastrointestinales, oculares, del trato urinario y también síndromes neurológicos graves. El presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar HAdV en muestras de heces provenientes de pacientes oriundos de la Región Norte de Brasil, en el período de 1998 a 2012, con cuadro de parálisis flácida aguda, negativas para poliovirus y enterovirus no polio. En el estudio, 19 muestras presentaron efecto citopático característico de HAdV cuando inoculadas en los linajes HEp2-C y L20B. Esas muestras fueron sometidas a reacción en cadena mediada por polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR) y secuenciación nucleotídica parcial del gen que codifica la proteína hexón. Del total de muestras, 13 fueron confirmadas por qPCR, PCR y secuenciación nucleotídica. El análisis genético demostró la siguiente caracterización viral: una muestra como HAdV-F41; tres como HAdV-A31 y nueve de la especie C, siendo tres HAdV-C5 y seis HAdV-C6. Las muestras positivas fueron provenientes de los Estados de Pará (6/19 – 31,6%), Amazonas (6/19 – 31,6%) y Acre (1/19 – 5,2%). Con relación a la franja etaria, de los 13 casos positivos, 12 eran de niños menores a 5 años de edad, representando 92,3% de los casos. Los resultados hallados sugieren una posible participación de los HAdV en la etiología de los casos de parálisis flácida aguda ocurridos en la Región Norte de Brasil.

Palabras clave: Adenovirus Humanos; Parálisis Flaccida Aguda; Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa; Técnicas de Cultivo de Célula.



REFERÊNCIAS

- 1 Wold WS, Ison MG. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1732-67.
- 2 Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, et al. Novel human adenovirus strain, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2012 May;18(5):846-8.
- 3 Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, et al. Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus D associated with acute gastroenteritis. Genome Announc. 2013 Jan;1(1):e00068-12.
- 4 Jones II MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, Cruz WP, Riedel B, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. J Virol. 2007 Jun;81(11):5978-84.
- 5 Ghebremedhin B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. Eur J Microbiol Immunol. 2014 Mar;4(1):26-33.
- 6 Peltékian E, Garcia L, Danos O. Neurotropism and retrograde axonal transport of a canine adenoviral vector: a tool for targeting key structures undergoing neurodegenerative processes. Mol Ther. 2002 Jan;5(1):25-32.

- 7 Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, et al. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol.* 2002 May;76(9):4612-20.
- 8 Legrand V, Spehner D, Schlesinger Y, Settelen N, Pavirani A, Mehtali M. Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):907-19.
- 9 Von Seggern DJ, Chiu CY, Fleck SK, Stewart PL, Nemerow GR. A helper-independent adenovirus vector with E1, E3 and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1601-8.
- 10 Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* 2004 May;322(2):349-59.
- 11 Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992 Jun;37(2):149-57.
- 12 Echavarría M. Adenoviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD. Principles and practice of clinical virology. 5th ed. John Wiley & Sons; 2004. p. 343-60.
- 13 Cardoso MJ, Krishnan S, Tio PH, Perera D, Wong SC. Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibuluan, Sarawak. *Lancet.* 1999 Sep;354(9183):987-91.
- 14 Lum LC, Wong KT, Lam SK, Chua KB, Goh AY. Adenovirus in EV71-associated hand, foot, and mouth disease. *Lancet.* 2000 Jan;355(9198):146-7.
- 15 Ivanova OE, Yurashko OV, Ereemeeva TP, Baikova OY, Morozova NS, Lukashev AN. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients. *J Med Virol.* 2012 Jan;84(1):75-80.
- 16 Ooi MH, Wong SC, Clear D, Perera D, Krishnan S, Preston T, et al. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Infect Dis.* 2003 Mar;36(5):550-9.
- 17 Azevedo JP, Nascimento LR, Cortinovis MC, Oliveira SS, Costa EV, Silva EE. Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases. *J Clin Virol.* 2004 Dec;31(4):248-52.
- 18 Belsy A, Odalys V, Alexander P, Clara S, Angel G, Grehete G, et al. Molecular characterization of adenoviral infections in Cuba: report of an unusual association of species D adenoviruses with different clinical syndromes. *Arch Virol.* 2009 Apr;154(4):619-27.
- 19 World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
- 20 Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Åkerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* 2003 Jun;70(2):228-39.
- 21 Pring-Åkerblom P, Trijssenaar 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.
- 22 Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4114-20.
- 23 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- 24 Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14(9):817-8.
- 25 Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 2006 Aug;22(21):2688-90.
- 26 Silva EE, Fillipis AM, Schatzmayr HG, Cortes LC. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Jan-Mar;85(1):131-2.
- 27 Silva EE, Winkler MT, Pallansch MA. Role of enterovirus 71 in acute paralysis after eradication of poliovirus in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 1996 Jul-Sep;2(3):231-3.
- 28 Hovi T, Stenvik M. Surveillance of patients with acute flaccid paralysis in Finland: report of a pilot study. *Bull World Health Organ.* 2000;78(3):298-304.
- 29 Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, et al. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan province, the people's Republic of China. *J Med Virol.* 2008 Apr;80(4):670-9.
- 30 Ory F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol.* 2012 Mar;85(3):554-62.

- 31 Liu EB, Ferreyra L, Fischer SL, Pavan JV, Nates SV, Hudson NR, et al. Genetic analysis of a novel human adenovirus with a serologically unique hexon and a recombinant fiber gene. *PLoS One*. 2011 Sep;6(9):e24491-501.
- 32 Robinson CM, Shariati F, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37: new insights into corneal tropism. *BMC Genomics*. 2008 May;9(213):1-12.
- 33 Robinson CM, Shariati F, Zaitshik J, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Human adenovirus type 19: genomic and bioinformatics analysis of a keratoconjunctivitis isolate. *Virus Res*. 2009 Jan;139(1):122-6.
- 34 Roy S, Calcedo R, Medina-Jaszek A, Keough M, Peng H, Wilson JM. Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PLoS One*. 2011 Sep;6(9):e24859.

Recebido em / Received / Recibido en: 7/3/2014
Aceito em / Accepted / Aceito en: 12/6/2014