

## Detección de adenovirus en lavados broncoalveolares de pacientes cubanos infectados por el VIH

Grehete González-Muñoz<sup>1</sup>, Olga Poumier<sup>2</sup>, Alexander Piñón<sup>1</sup>, Clara Savón<sup>1</sup>, Odalys Valdés<sup>1</sup>, Belsy Acosta<sup>1</sup>, Ángel Goyenechea<sup>1</sup>, Suset Oropesa<sup>1</sup>, Guelsys González-Báez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Vicedirección de Atención Médica, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba

### RESUMEN

**Introducción.** La significación de la infección por Adenovirus (AdV) en pacientes inmunocomprometidos ha sido firmemente establecida. Estas infecciones tienen el potencial de causar enfermedad diseminada, con altos índices de mortalidad, y son consideradas un gran problema en el cuidado de estos pacientes.

**Objetivo.** Investigar el papel de los adenovirus en las infecciones respiratorias en pacientes cubanos infectados por el VIH y caracterizar los aislamientos obtenidos en especies y serotipos, utilizando técnicas de biología molecular.

**Materiales y Métodos.** Fueron investigadas prospectivamente 21 muestras de líquidos broncoalveolares de pacientes seropositivos al VIH, con síntomas respiratorios de larga evolución, de etiología no precisada, dentro de los cuales predominaba la neumonía a repetición que, a pesar de la terapia antibiótica, permanecían sin resolver. El diagnóstico inicial fue realizado mediante PCR y aislamiento viral. La identificación y caracterización en serotipos de los aislamientos fue realizada por métodos de PCR. Fueron investigados, además, otros patógenos respiratorios tales como bacterias y hongos.

**Resultados.** De las 21 muestras, en 10 de ellas (48%) fue detectada la presencia de AdV y el virus fue aislado en siete (70%). La neumonía fue la manifestación clínica predominante en el

50% de los casos positivos. Los AdV encontrados pertenecieron a las especies B (28%) y C (71%), serotipo 3 y serotipos 1 y 2, respectivamente. En el 80% de los casos, AdV fue encontrado como único patógeno y en 2 (20%) fue detectado junto con bacterias.

**Conclusiones.** Se identificaron a los adenovirus como causantes de infección respiratoria en pacientes seropositivos al VIH, particularmente las especies B y C; por lo que su inclusión en los complementarios de rutina sería útil para el manejo y tratamiento del paciente VIH con infección respiratoria. La combinación de técnicas clásicas y moleculares, introducidas en el laboratorio, resultaron útiles para el diagnóstico, la identificación y la caracterización de este grupo viral.

**Palabras claves:** adenovirus, infección respiratoria viral, pacientes inmunocomprometidos, líquidos broncoalveolares

### ABSTRACT

#### Detection of adenoviruses from bronchoalveolar lavage fluid in HIV- infected Cuban patients

**Introduction.** The significance of AdV infection in immunocompromised patients has been firmly established. These infections have the potential

**Autor para correspondencia:** Lic. Grehete González Muñoz. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía Km. 61/2, La Lisa. La Habana, Cuba. E-mail: greg@ipk.sld.cu

**Recibido:** el 20 de septiembre de 2011. **Aceptado para publicación:** el 28 de noviembre de 2011

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112234.pdf>

to cause disseminated disease with high mortality rates, and the clinical management of infected patients is a major problem.

**Objective.** To research the role of Adenovirus in Respiratory Infections in HIV-infected Cuban patients, and to characterize the isolates obtained in species and serotypes using Molecular Biology techniques.

**Materials and Methods.** 21 samples of bronchoalveolar lavage fluid from HIV-positive patients with respiratory symptoms of prolonged evolution with uncertain etiology, in which there was a predominance of chronic pneumonia were researched. In spite of antibiotic therapy, their problems remained unresolved. The initial diagnoses were performed by PCR and viral cultures. The identification and typing of AdV isolates were achieved by PCR. Other respiratory pathogens, such as bacteria and fungi were also investigated.

**Results.** In 10 (48%) out of the 21 samples the presence of AdV was detected, and the virus was isolated in 7 of them (70%). Pneumonia was the predominant clinical manifestation (50 % of the cases). The AdV found belonged to species B (28%) and C (71%), type 3 and types 1 and 2, respectively. In 80% of the cases, only AdV was found, and in 20% AdV was found together with bacteria.

**Conclusions.** Adenoviruses were identified as causative for respiratory infections in HIV-positive patients, particularly the B and C species. For that reason, including them in diagnostic testing would be useful in treating and managing HIV patients with respiratory infections. The combination of classical and molecular techniques proved very effective in diagnosing, identifying and characterizing adenoviruses.

**Key words:** adenovirus, viral respiratory infections, immunocompromised patients, bronchoalveolar lavage fluid

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones por adenovirus han sido tradicionalmente asociadas con enfermedades

respiratorias, oculares y gastrointestinales, principalmente en niños y personal militar como infecciones endémicas o durante brotes epidémicos (1). Durante las últimas décadas, el papel de adenovirus como un patógeno viral de elevada morbilidad y mortalidad en el paciente inmunocomprometido se ha incrementado significativamente. Este fenómeno está asociado con el crecimiento de la población inmunocomprometida, ya sea debido a terapias inmunosupresivas por enfermedades como el cáncer, individuos trasplantados, malnutrición y aumento de la epidemia del SIDA a nivel global (2).

Numerosos reportes evidencian que las infecciones respiratorias virales son, además, un factor de riesgo para el posterior desarrollo de neumonías bacterianas y fúngicas, sugiriendo la interacción bidireccional entre ambos como factor predisponente al cuadro severo (3). Los virus inducen un daño epitelial local alterando la función respiratoria, regulan y modifican la expresión de los receptores celulares, alteran el sistema inmune innato y las bacterias pueden amplificar la patogenicidad de los virus y amplificar la inflamación (4).

En individuos con una respuesta inmune dañada, como los pacientes con SIDA, las infecciones por adenovirus son comunes; al tomar ventaja de esta situación, ellos pueden desarrollar infecciones agudas y persistentes mostrando severas manifestaciones clínicas con altos índices de letalidad. El espectro de estas manifestaciones es variado; entre las principales enfermedades se encuentra la infección respiratoria, siendo la neumonía la forma más avanzada de progresión de la infección respiratoria con tasas de mortalidad de hasta 60% (5).

Relativamente poco es conocido acerca del impacto de la infección respiratoria aguda por adenovirus en pacientes infectados con el VIH y, a pesar de que se realizan análisis exhaustivos, el 25% de las IRA permanecen sin un diagnóstico etiológico, lo que sugiere que los patógenos causales no se encuentran incluidos en los procedimientos de diagnóstico actuales. Identificar

## Adenovirus en pacientes con VIH

a los adenovirus como agentes causales de IRA en pacientes seropositivos al VIH, esencialmente en los casos de neumonía, constituyó el objetivo central de este trabajo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio.** Descriptivo de serie de casos.

**Universo de estudio.** Estuvo constituido por la totalidad de los pacientes seropositivos al VIH a quienes fue indicada una broncoscopia por presentar una afección respiratoria con etiología no precisada durante el año 2007.

**Tamaño de la muestra y características de la población.** Fueron analizados 21 lavados broncoalveolares (LBA), procedentes de pacientes seropositivos al VIH que presentaban síntomas respiratorios de evolución prolongada, por lo cual se encontraban hospitalizados. Dentro de los síntomas, predominaban la neumonía a repetición y un síndrome febril prolongado (SFP), además de otros síntomas respiratorios como tos, expectoración, falta de aire y fiebre. Otros presentaban también malestar general, anorexia, marcada pérdida de peso y astenia. Todos los pacientes fueron adultos, con edades comprendidas entre 27 y 48 años (media 39 años).

**Diagnóstico de la infección por adenovirus**  
**Detección del genoma viral por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** El ácido nucleico viral fue extraído de una alícuota de 200  $\mu$ L de la muestra clínica, utilizando el método de tiocianato de guanidinio descrito previamente (6) y que permite la extracción tanto de ADN como de ARN. Brevemente, estos 200  $\mu$ L de muestra fueron adicionados a 600  $\mu$ L de buffer de lisis (Tiocianato de guanidinio 5M, citrato de sodio 1M, ditiotreitol 1M, sarkosyl 3%, glicógeno 20 mg/mL) que contenían 400 copias de ADN clonado como control interno del ensayo. Esta mezcla fue agitada vigorosamente durante 10 segundos. Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 600  $\mu$ L de iso-

propanol frío. Seguidamente, se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se descartó toda la fase líquida y se le adicionó al sedimento 1 mL de etanol al 70 % frío y fue centrifugado a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La fase líquida fue descartada y el sedimento fue diluido en 20  $\mu$ L de agua estéril libre de RNAsas (Sigma); 5  $\mu$ L del producto extraído fue utilizado para desarrollar la técnica de RT-PCR descrita posteriormente.

La reacción de amplificación (RT-múltiple) incluyó un paso previo de reverso-transcripción (RT), que consistió en un ciclo de 45 minutos a 48°C y 2 minutos a 42°C, seguida de dos rondas de amplificación (RT-PCR anidada), previamente descrita (7), que permiten detectar en un mismo tubo de reacción la presencia de todas las especies de Adenovirus y otros agentes virales RNA causantes de IRA. El uso del control interno en el buffer lisis resultó útil para el chequeo del proceso de extracción, la eficiencia de la amplificación y la presencia de inhibidores en la muestra clínica. El control negativo empleado consistió en agua estéril libre de RNAsas (Sigma), que fue procesada siguiendo el mismo esquema utilizado para el procesamiento de las muestras clínicas. Los resultados de las investigaciones bacteriológicas y micológicas, así como de *Mycobacterium tuberculosis*, fueron extraídos de las historias clínicas.

**Aislamiento en cultivo celular.** Se utilizaron dos líneas celulares continuas que han sido descritas para el aislamiento viral, dada su susceptibilidad a los Adenovirus: Hep-2 (carcinoma laríngeo humano) y A-549 (carcinoma de pulmón humano), ambas procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC). El medio de mantenimiento utilizado fue medio esencial mínimo (MEM) (Difco) con glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales, suero bovino fetal (SBF) (*Integra Biosciences*, UK) al 2%, con penicilina y estreptomycinina al 0.1%, pH 7.2-7.4. Las células fueron observadas diariamente durante un período de 7 a 10 días al microscopio invertido, en busca de la aparición del efecto citopático (ECP). Antes de informar una muestra como negativa, se realizaron

3 pases ciegos en las mismas condiciones. Los tubos con ECP fueron identificados posteriormente.

**Identificación.** A los tubos de cultivos que presentaron efecto citopático sugestivo de AdV, se les realizó una extracción de ADN directamente del aislamiento original, utilizando proteinasa K, de acuerdo con el método descrito por Tenorio *et al.* en 1993 (8). A 39.5 µL del cultivo se le adicionó 10 µL de Tampón lisis y 0.5 µL de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml. Esta mezcla se incubó a 56°C durante 45 minutos en bloque térmico y la enzima fue inactivada posteriormente a 95°C durante 10 minutos. De esta extracción se tomaron 5 µL para la reacción de amplificación. La identificación se llevó a cabo posteriormente mediante una PCR de tipo genérico en una sola ronda de reacción, el cual utiliza cebadores de la región conservada del exón en los 51 serotipos de adenovirus humanos conocidos, diseñados a partir de secuencias publicadas previamente en el Gene Bank (9).

**Caracterización de los aislamientos.** Los aislamientos ya identificados por PCR genérico fueron clasificados en especies, mediante un ensayo de PCR múltiple empleando oligonucleótidos especie-específicos, complementarios a la región del gen de la fibra de cada una de las especies (9) y diseñados a partir de secuencias del gen de la fibra disponibles en el Gen Bank, y evaluado para su especificidad con otros virus ADN como herpes simple 1 y 2, virus Epstein Barr, citomegalovirus, parvovirus humano B-19, entre otros. Una vez que los aislamientos fueron clasificados en especies (A-F), se procedió a determinar el serotipo; para ello, fueron desarrollados diferentes métodos de PCR que abarcaron los serotipos que comúnmente causan infección respiratoria (AdVs 1-7, 14 y 21). Para la determinación de los serotipos de la especie B (AdV-3, AdV-7 y AdV-21), fue desarrollado una PCR múltiple con juegos de cebadores de diferentes regiones de los lazos 1 y 2 del gen del exón (10), mientras que para el serotipo 14 fue utilizado un método simple con cebadores que

también flanqueaban al gen del exón (11). Para los aislamientos pertenecientes a la especie C (AdV-1, AdV-2, AdV-5 y AdV-6), fue utilizado un PCR múltiple de la región de la fibra (12).

## RESULTADOS

Fueron investigadas veintiún muestras con infección respiratoria de curso prolongado de etiología no precisada, procedentes de pacientes seropositivos al VIH cuyas edades oscilaban entre 27 y 48 años. Todos los pacientes se encontraban hospitalizados al momento de la colecta de la muestra por los síntomas respiratorios antes referidos, con tratamiento antibiótico de amplio espectro y, en 66.6 % de ellos, la infección por VIH había progresado a SIDA.

De las 21 muestras analizadas, en 10 (48%) fue detectada la presencia de AdV por PCR y en siete de éstas (70%) el virus fue aislado. En 8 de los 10 casos positivos (80%), AdV fue encontrado como único patógeno y en 2 (20%) fue detectado concomitantemente junto a bacterias (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*) y, en uno de éstos, junto al virus del herpes humano tipo 8, asociado a un paciente con sarcoma de Kaposi. En cinco de los diez pacientes positivos, la neumonía constituyó la manifestación clínica predominante.

Los AdV encontrados en estos pacientes pertenecen a las especies B (28.5%), todos serotipo 3, y C (71.4%), serotipos 1 y 2.

En el **Cuadro 1** se muestran los resultados de las veintiún muestras de LBA investigadas, con las especies y serotipos encontrados, así como el resultado de la detección de otros patógenos respiratorios.

## DISCUSIÓN

Aunque se conoce que los adenovirus causan infección respiratoria en todos los grupos de edades, relativamente poco es conocido acerca del impacto de la infección en pacientes infectados con el VIH. A pesar

**Cuadro 1**  
**Frecuencia de casos positivos a la infección por AdV en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes cubanos infectados con el VIH**

No. de casos	Aislamiento	Especie/ tipo	Manifestaciones clínicas		Estadio clínico		Resultados de otros patógenos			
			Neumonía	OSR	VIH	SIDA	OVR	Bact.	Hongos	BAAR
AdV+ (n=10)	7	B-3(n=2) C-1(n=2) C-2(n=3)	5	5	2	8	0	2	0	0
AdV- (n=11)	0	0	2	9	5	6	0	7	1	1
Totales (n=21)	7	B-2 C-5	7	14	7	14	0	9	1	1

**OSR: Otros síntomas respiratorios**

**OVR: Otros virus respiratorios (Influenza A, B y C y Virus sincitial respiratorio A y B)**

**BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes**

de que se realizan análisis exhaustivos, el 25% de las infecciones respiratorias permanecen sin un diagnóstico etiológico, lo que sugiere que los patógenos causales no se encuentran incluidos en los procedimientos de diagnóstico actuales (13).

Este estudio mostró la presencia de AdV en 10 de los 21 casos de las muestras investigadas por PCR, de los cuales en 7 de ellos fue aislado el virus, confirmando en 70% de los casos los resultados de PCR y permitiendo, además, la caracterización del agente a nivel de serotipo por métodos moleculares.

Algunos reportes han estimado prevalencias más altas que la encontrada en esta investigación, pero han sido realizados por técnicas de PCR en tiempo real, que exhiben una mayor sensibilidad respecto al PCR convencional (13). Otros estudios han descrito prevalencias que van de 3 a 20%, para diferentes virus respiratorios, en LBA de pacientes inmunocomprometidos con enfermedad pulmonar (14,15). En este estudio resultó más elevada y consideramos que está relacionada, en primer término, con el criterio de selección de la muestra y el tipo de muestra investigada, pacientes inmunocomprometidos con enfermedad respiratoria en los cuales se ha encontrado una respuesta ineficiente de linfocitos T-CD4 en los LBA, especialmente en fase SIDA (16); en segundo lugar, con el empleo de métodos que como el PCR incrementan la sensibilidad y la especificidad de la detección y que, con el empleo del cultivo celular

solamente, permanecen subestimando el verdadero impacto de estos virus (17).

Resultó un hallazgo sorprendente el hecho de que, en 5 de los 8 pacientes donde solamente fue detectado AdV, el cuadro fue mucho más severo (neumonía) que donde AdV fue detectado junto a otros patógenos. Este hecho, unido al aislamiento viral en tres de estos cinco casos con neumonía, nos sugiere que la presencia de AdV no fue un hecho casual.

De forma general, este grupo de 8 casos donde AdV fue encontrado como único patógeno podría representar pacientes donde AdV sea la única causa de todos los síntomas y que los cinco pacientes con neumonía sean producto de la complicación de la infección viral. Tampoco es descartable que estos ocho casos sean representativos de pacientes en los que otros patógenos bacterianos fueran exitosamente tratados y que la existencia del virus fuera sólo los restos de una infección persistente. En ambos casos, nuestros hallazgos apoyan la contribución de AdV a la severidad de la enfermedad respiratoria.

El hecho de que todos los pacientes tuvieran una inmunosupresión severa (SIDA) es consistente con lo descrito anteriormente, de que el adecuado funcionamiento de ambas respuestas, humoral y celular, son necesarias para la eliminación viral (18) y, por ello, es común que estos pacientes sean un blanco frecuente para los virus respiratorios con una fuerte tendencia a causar complicaciones en

el tracto bajo (16).

Los AdVs aislados pertenecen a las especies B y C, que al igual que en otros estudios son las que, de manera usual, se detectan en el tracto respiratorio de pacientes con inmunodeficiencias adquiridas, como trasplantados y seropositivos al VIH (19- 20), y han sido responsabilizadas de las manifestaciones respiratorias, posiblemente producto de una reactivación en el caso de las especies C o de una infección primaria por especies B, que normalmente se encuentran circulando en la comunidad y que pueden ser transmitidas a estos pacientes, cuyo debilitamiento del sistema inmune hace más severas y prolongadas las manifestaciones clínicas (2).

El desarrollo de metodologías que emplean ensayos cuantitativos y que generan patrones de carga viral serían más informativas con respecto al papel patogénico; tales estrategias de PCR son ahora diseñadas para la vigilancia, la detección temprana y la respuesta a la terapia en pacientes de alto riesgo (21-25).

En conclusión, este estudio muestra, aunque en un limitado número de casos, que la detección de Adenovirus en lavados broncoalveolares de pacientes VIH debe ser incluida en los análisis complementarios indicados al paciente seropositivo con síntomas severos que involucran el tracto respiratorio bajo. Este diagnóstico podría ser útil en el manejo y el tratamiento del paciente VIH+ con enfermedad respiratoria, evitando el uso de antibióticos y valorando el inicio de un tratamiento antiviral.

#### REFERENCIAS

1. **Wold WSM, Horwitz MS.** Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2007.p 2395-436.
2. **Echavarría M.** Adenoviruses in Immunocompromised Host. *Clin Microbiol Rev* 2008; 7704-15.
3. **Milstone AP, Brumble LM, Barnes J, et al.** A single - season prospective study of respiratory viral infections in lung transplant recipients. *Eur Respir J* 2006; 28: 131- 7.
4. **McCullers JA.** Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 571-82.
5. **Kojoaghlanian T, Flomenberg P, Horwitz M.** The impact of Adenovirus infections on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* 2003; 13:155-71.
6. **Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM.** New method for extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1995; 53: 25-36.
7. **Coiras MT, Pérez- Breña P, Garia ML, Casas I.** Simultaneous detection of Influenza A, B, and C viruses, Respiratory Syncytial Virus A and B and Adenovirus in clinical samples by multiplex RT-nested PCR assay. *J Virol Methods* 2003; 69: 132-44.
8. **Tenorio A, Echevarría J, Casas I, J.M. Echevarría JM, Tabares E.** Detection and typing of human herpesviruses by multiplex PCR. *J Virol Methods* 1993; 44: 261-69.
9. **Xu W, McDonough MC, Erdman DD.** Specie - specific identification of human Adenoviruses by multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4114-20.
10. **Xu W and Erdman.DD.** Type-specific identification of human adenovirus 3, 7 and 21 by a multiplex PCR assay. *J Med Virol* 2001; 64: 537-42.
11. **Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, Hawksworth AW, Irvine M, Russell KL.** Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis* 2007; 196: 1465-73.
12. **Adhikary AK, Inada T, Banik U, Numaga J, Okabe N.** Identification of subgenus C Adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 670-3.
13. **Ison M.** Respiratory viral infections in transplants recipients. *Antiviral Therapy* 2007; 12: 627-38.
14. **Connolly MG, Baugham RP, Dohn MN, Linnemann CC.** Recovery of viruses other than cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1994; 105: 1775-81.
15. **Rabella N, Rodríguez P, Labeaga R, Otequi M, Mercader M, Gurqui M, et al.** Conventional respiratory viruses recovered from immunocompromised patients: clinical considerations. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1043- 8.
16. **Jambo KC, Sepako E, Fullerton DG, Mzinza D, Glennie S, Wright AK, et al.** Bronchoalveolar CD4+T cell responses to respiratory antigens are impaired in HIV infected adults. *Thorax* 2011; 66: 375-82.
17. **Ison MG, Green M.** Adenovirus in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 (suppl 4): 161-5
18. **Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Kolarova L, Nicod LP, Rochat T, et al.** Respiratory Viruses

- and Severe Lower Respiratory Tract Complications in Hospitalized Patients. *Chest* 2004; 125: 1033-9.
19. **Zheng X, Lu X, Erdman DD, Anderson E, Guzman- Cottrill J, Kletzel M, et al.** Identification of Adenoviruses in specimens from High- Risk Pediatric Stem Cell Transplant Recipients and Controls. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (1): 317-20.
  20. **Ebner K, Rauch M, Preuner S, Lion T.** Typing of Human Adenoviruses in Specimens from Immunosuppressed Patients by PCR- Fragment Length Analysis and Real – Time Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (8): 2808-15.
  21. **Lion T, Baumgartner R, Watzinger F, Matthesmartin S, Suda M, Preuner S, et al.** Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits an early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003; 102: 1114-20.
  22. **Leruez- Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, et al.** Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infections. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 45-52.
  23. **Humar A, Doucette K, Kumar D, Pang XL, Lien D, Jackson K, et al.** Assessment of adenovirus infections in adult lung transplant recipients using molecular surveillance. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1441-6.
  24. **Hoffman J.** Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 625- 33.
  25. **Heim A.** Advances in the management of disseminated adenovirus disease in stem cell transplant recipients: impact of adenovirus load (DNAemia) testing. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(11): 943–945