

EULDES NEI ROSADO FILHO

**PREVALÊNCIA DE ADENOVÍRUS COMO AGENTE CAUSADOR DE
CONJUNTIVITE EM CLÍNICA MÉDICA OFTALMOLÓGICA
ESPECIALIZADA NOS ANOS DE 2009 E 2010**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R788p
2011

Rosado Filho, Eudes Nei, 1971-

Prevalência de adenovírus como agente causador de conjuntivite em clínica médica oftalmológica especializada nos anos de 2009 e 2010 / Eudes Nei Rosado Filho. – Viçosa, MG, 2011.

xii, 55f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-40

1. Adenoviridae. 2. Conjuntiva - Doenças. 3. Oftalmologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

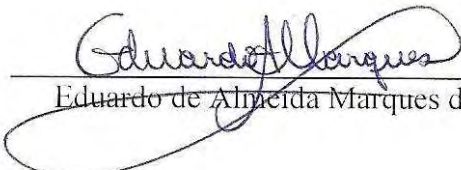
CDD 22. ed. 579.2443

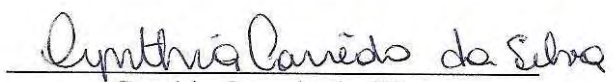
EULDES NEI ROSADO FILHO


**PREVALÊNCIA DE ADENOVÍRUS COMO AGENTE CAUSADOR DE
CONJUNTIVITE EM CLÍNICA MÉDICA OFTALMOLÓGICA
ESPECIALIZADA NOS ANOS DE 2009 E 2010**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de dezembro de 2011.


Eduardo de Almeida Marques da Silva


Cynthia Canedo da Silva


Leandro Licursi de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o mestrado, e ao Departamento de Biologia, pela acolhida durante este período, nas pessoas de seus professores e funcionários.

À Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE), por todo suporte ao desenvolvimento desta pesquisa.

Aos pacientes, pela compreensão e participação nesta pesquisa.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio e incentivo a esta pesquisa.

Ao Laboratório de Genômica, pela execução do sequenciamento das amostras.

Ao professor Dr. Sérgio Oliveira de Paula, pela acolhida no Laboratório de Imunologia e Virologia e pelo seu exemplo de trabalho, desenvoltura e sinceridade.

Ao professor Dr. Clovis Andrade Neves, pela compreensão, pela ajuda e pelo incentivo.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia e Imunologia, pelo exemplo de trabalho e amizade e pela colaboração nos procedimentos.

Ao meu orientador, professor Dr. Leandro Licursi de Oliveira, pelo apoio e exemplo de pessoa e, em especial, por deixar em estio o tempo nebuloso do desconhecido, tornando claros os caminhos pelos quais devem ser seguidos. À sua esposa Silvia e ao seu filho Lucas, os quais diretamente e indiretamente estiveram presentes nesta pesquisa.

À minha querida esposa Dorilene e aos meus filhos Daniel e Lucas, pela compreensão, pelo carinho e pelo apoio. Aos meus pais, Maria Lília e Nei, por toda

minha educação, pelo carinho, pela ajuda e pela presença em minha vida e em meu trabalho. Às minhas irmãs Liliane e Clenize. A Doraliza Monteiro, Shirley Torres e ao Rogério Calazans, pelo incentivo e pela grande ajuda.

A todos das famílias Rosado, Torres, Pereira, Ladeira, Monteiro e Abranches; em especial, aos meus avós, Sinhó (*in memoriam*), Milita, Marcina (*in memoriam*) e Voim (*in memoriam*).

A Deus, pela saúde, por tudo que criou e por estar presente a todo instante.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Conjuntivites e seus aspectos imunológicos | 1 |
| 1.2. Adenovírus | 7 |
| 1.3. PCR como auxílio diagnóstico | 11 |
| 1.4. Objetivo | 13 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 2.1. Amostras clínicas | 14 |
| 2.2. Extração de DNA viral | 15 |
| 2.3. Amplificação por PCR | 15 |
| 2.4. Sequenciamento | 17 |
| 3. RESULTADOS | 18 |
| 3.1. Estudos das amostras de conjuntivite viral | 23 |
| 4. DISCUSSÃO | 31 |

| | |
|---------------------|----|
| 5. CONCLUSÕES | 34 |
| REFERÊNCIAS..... | 35 |
| APÊNDICE..... | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação de Adenovírus humanos | 10 |
| Tabela 2 - PCR Master Mix: preparo para 100 reações..... | 16 |
| Tabela 3 - Resumo dos dados de PCR..... | 22 |
| Tabela 4 - Porcentagem de similaridade de 11 amostras PCR + para Adenovírus submetidas a seqüenciamento | 23 |
| Tabela 5 - Análise das amostras | 23 |
| Tabela 6 - Estatística descritiva das idades das pessoas que compõem as amostras | 24 |
| Tabela 7 - Frequência de conjuntivite clinicamente adenoviral | 26 |
| Tabela 8 - Frequência de conjuntivite adenoviral nas amostras confirmada por PCR... | 27 |
| Tabela 9 - Comparação da ocorrência do quadro clinicamente positivo com os resultados do PCR..... | 27 |
| Tabela 10 - Estatística descritiva do tempo médio de evolução | 28 |
| Tabela 11 - Avaliação da frequência de sintomatologia..... | 29 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Conjuntiva: seta identificando conjuntiva bulbar. | 2 |
| Figura 2 - Distribuição do tecido linfoide na conjuntiva e pálpebra: A (esquema de localização dos folículos) e B (corte histológico da conjuntiva bulbar)..... | 3 |
| Figura 3 - Córnea: A (córnea em corte histológico) e B (esquema das camadas da córnea). | 4 |
| Figura 4 - Sintomas de conjuntivite: A (hiperemia conjuntival e pálpebra), B (reação folicular) e C (infiltrados numulares). | 6 |
| Figura 5 - Esquema Adenovírus. | 9 |
| Figura 6 - Método de coleta: A (amostra da secreção e swab, sendo depositada em Eppendorf com PBS) e B (lâmpada de fenda Topcon 3E usada no procedimento). | 15 |
| Figura 7 - Equipamentos usados: A (mix feito em capela de fluxo) e B (reação feita em termociclador Eppendorf no Laboratório de Imunovirologia). | 16 |
| Figura 8 - Câmara de UV para revelação do Gel em UV, gel Red..... | 17 |
| Figura 9 - Eletroforese das amostras de 1 a 13, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo). | 18 |
| Figura 10 - Eletroforese das amostras de 14 a 25, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (Neg = controle negativo, Posit = controle positivo). | 19 |
| Figura 11 - Eletroforese das amostras de 26 a 36, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (Neg = controle negativo, Posit = controle positivo). | 19 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 - Eletroforese das amostras de 37 a 47, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo). | 20 |
| Figura 13 - Eletroforese das amostras de 48 a 59, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, Posit = controle positivo). | 20 |
| Figura 14 - Eletroforese das amostras de 60 a 70, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo). | 21 |
| Figura 15 - Eletroforese das amostras de 71 a 81, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, Posit = controle positivo). | 21 |
| Figura 16 - Eletroforese das amostras de 82 a 91, com aplicação de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo). | 22 |
| Figura 17 - Distribuição das amostras por idade. | 24 |
| Figura 18 - Distribuição das amostras por sexo. | 25 |
| Figura 19 - Época de ocorrência dos casos de conjuntivite viral e clinicamente adenoviral. | 25 |
| Figura 20 - Época de ocorrência de conjuntivite viral e conjuntivite adenoviral confirmada por PCR. | 26 |
| Figura 21 - Sorotipos identificados por sequenciamento. | 30 |

RESUMO

ROSADO FILHO, Euldes Nei, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Prevalência de adenovírus como agente causador de conjuntivite em clínica médica oftalmológica especializada nos anos de 2009 e 2010.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Clóvis Andrade Neves.

O Adenovírus (AdV) é um dos agentes etiológicos mais frequente da conjuntivite; está associado a surtos e epidemias de conjuntivite com rápida disseminação, podendo também causar infecções em vias áreas superiores (IVAS), cistite, gastroenterite e quadros de infecção mais grave como pneumonia e miocardite. As conjuntivites virais manifestam-se como vermelhidão nos olhos, lacrimejamento, secreção ocular aquosa, fotofobia, desconforto ocular e com frequência também com baixa visual decorrente de ceratite. Neste trabalho, procurou-se aferir a prevalência do Adenovírus como agente causador de conjuntivite em uma clínica oftalmológica localizada na cidade de Viçosa, Minas Gerais, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Caracterizaram-se sorotipos presentes em 11 amostras positivas, selecionadas aleatoriamente por meio de sequenciamento e genotipagem. Com objetivo de definir a frequência do Adenovírus como agente etiológico de conjuntivite foram coletadas amostras da secreção conjuntival de 91 pacientes. Após extração de DNA, as amostras foram submetidas à reação de PCR com *primer* específico para Adenovírus. Nas amostras em que havia o Adenovírus, houve amplificação de uma banda de 301 pb, correspondente a uma parte do gene da proteína estrutural II , do capsídeo Hexon, comum a vários Adenovírus.

Com base nos achados de evolução e no exame oftalmológico com biomicroscopia de lâmpada de fenda seriada, houve suspeita de prevalência clínica de Adenovírus de 43,68%. A análise dos resultados do exame de PCR revelou prevalência de 36,3% de Adenovírus. Onze amostras PCR+ foram sequenciadas, revelando a presença dos sorotipos 8, 4, 7, 3, 34 e um do grupo D não tipado. A presença dos sorotipos 8, 4, 3 e 34 não foi surpreendente; entretanto, a do sorotipo 7 (grupo B) foi inesperada, pois há relatos associados a casos de infecção com evolução desfavorável e fatal, causada por variantes desse tipo, em decorrência de pneumonia e miocardite. A presença do Adenovírus na secreção conjuntival indentificada por PCR permite o diagnóstico preciso, podendo-se evitar uma antibioticoterapia desnecessária e cara, permitir medidas restritivas de contato e disseminação e alertar sobre a presença de sorotipos mais agressivos causadores de ceratoconjuntivite epidêmica, dentre outros agentes causadores de pneumonia, miocardite e gastroenterite.

ABSTRACT

ROSADO FILHO, Euldes Nei, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2011. **Prevalence of adenovirus as etiological agent of conjunctivitis in a specialized ophthalmological clinic in the years of 2009 and 2010.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Clovis Andrade Neves.

The adenovirus (AdV) is one of the most common etiological agents of conjunctivitis, being associated with outbreaks and epidemics of fast widespread conjunctivitis and might also cause upper respiratory tract infections, cystitis, gastroenteritis and scenarios of more serious infections such as pneumonia and myocarditis. The viral conjunctivitis shows up as redness in the eyes, tearing, watery eye, photophobia, ocular discomfort and often also as visual impairment due to keratitis/keratopathy. In this study, it had been sought to assess the prevalence of the adenovirus as the etiological agent of conjunctivitis in an ophthalmological clinic in the city of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, from January 2009 to December 2010. Serotypes present in 11 positive randomly selected samples have been characterized by sequencing and genotyping. In order to define the frequency of adenovirus as the etiological agent of conjunctivitis, samples were collected from the conjunctival secretion of 91 patients. After DNA extraction, samples were subjected to PCR with primers specific for Adenovirus. Samples that had the adenovirus, there has been an amplification of a band of 301 bp, corresponding to a part of the structural gene II protein, hexon capsid, common to multiple adenoviruses. Based on the findings of evolution and ophthalmological examination with slit-lamp

serial biomicroscopy, there was clinical suspicion of Adenovirus prevalence of 43.68%. The results of the PCR test showed a prevalence of Adenovirus in 36.3% of the samples. Eleven PCR + samples were sequenced, revealing the presence of serotypes 8, 4, 7, 3, 34 and one unclassified in group D. The presence of serotypes 8, 4, 3 and 34 was not surprising, however, of serotype 7 (group B) was unexpected, because there are reports associated with cases of unfavourable and fatal infection evolution, caused by variants of this type, due pneumonia and myocarditis. The presence of adenovirus in conjunctival secretion indentified through PCR allows a precise diagnosis, and avoiding unnecessary and expensive antibiotics, permitting restrictive measures of contact and dissemination and warning of the presence of more aggressive serotypes causing epidemic keratoconjunctivitis, among other etiological agents of pneumonia, myocarditis and gastroenteritis.

1. INTRODUÇÃO

O Adenovírus é um frequente agente etiológico da conjuntivite. A inflamação da conjuntiva é desagradável, inquietante e, muitas vezes, acompanhada de ceratite. A infecção adenoviral é de potencial gravidade em pessoas com comorbidade, como os imunossuprimidos, os muito jovens e os mais idosos. É um dos principais agentes de gastroenterite em crianças. Alguns sorotipos são mais virulentos; há relatos de doença pulmonar aguda grave e falência cardiovascular secundária à miocardite, mais frequentemente em crianças, associados ao grupo B, variante do sorotipo 7.

1.1. Conjuntivites e seus aspectos imunológicos

A conjuntiva se situa exposta, assim como a pele e outras mucosas, ao ambiente externo, protegendo o globo ocular, a esclera e o conteúdo da órbita. Vários agentes podem infectá-la e nela desencadear uma resposta inflamatória conhecida como conjuntivite. As conjuntivites podem ser caracterizadas clinicamente com base no tempo de permanência de seus sinais e sintomas, em aguda ou crônica, quando duram mais de um mês. De acordo com o padrão de resposta inflamatória, em folicular e em papilar. A conjuntivite folicular se caracteriza pelo encontro de pequenos nódulos conjuntivais mais pálidos na sua superfície, elevados e mais hiperemiados em sua base. Já a papilar é caracterizada pelo padrão em blocos, sendo mais hiperemiados na sua superfície e pálidos na base (KANSKI, 2011).



Fonte: Adaptado de Kanski (2011).

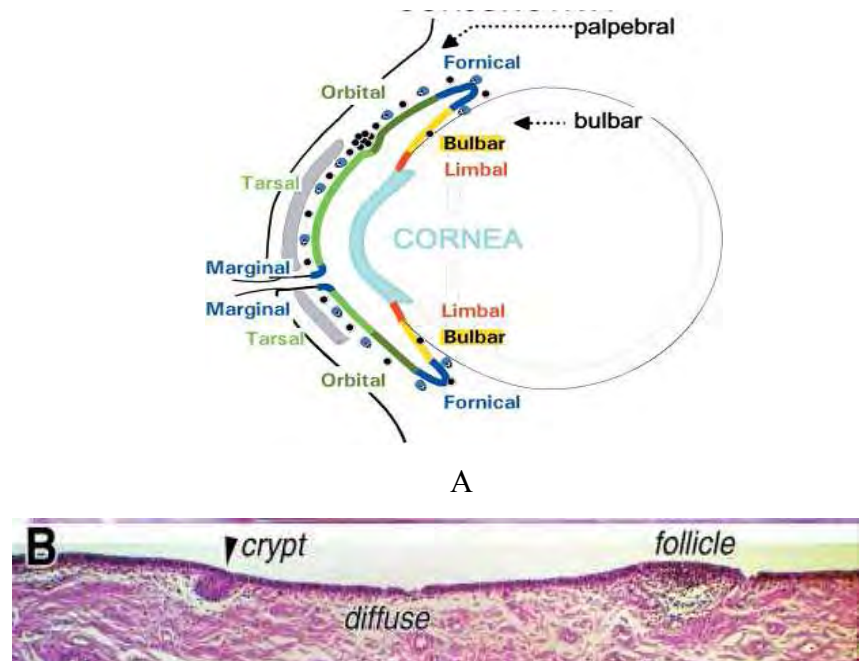
Figura 1 - Conjuntiva: seta identificando conjuntiva bulbar.

A superfície ocular é provida de especializados mecanismos de defesa contra infecções, que são inatos e adaptativos (ABBAS, 2008). A pálpebra com o piscar protege o olho de agentes externos, previne o ressecamento da superfície ocular e promove a troca lacrimal pelo seu fechamento periódico. Essa troca lacrimal dilui e remove microrganismos, pois a própria lágrima tem propriedades antimicrobianas; macromoléculas presentes na lágrima têm efeito contra microrganismo. A lisozima, que é presente em grande quantidade, pode degradar paredes bacterianas (McCLELLAN et al., 1997); a β -lisina pode romper membranas bacterianas (FRIEDLAND et al., 1972); a lactoferrina inibe o crescimento bacteriano, sequestrando o ferro, podendo aumentar a função dos anticorpos e ainda competir com os receptores virais pela ligação às glicosaminoglicanas, inseridas nas membranas das células-alvo (FLANAGAN et al., 2009). As imunoglobulinas são secretadas pela glandula lacrimal e pelo tecido linfóide associado à mucosa, em especial a IgA, que medeiam a imunidade antígeno específica (KNOP et al., 2008).

Estudo experimental em olhos de coelho *in vitro* com Gamagard S/D IgIV, fármaco que contém todas as classes de IgG e traços de IgA e IgM, mostrou-se efetivo contra múltiplos sorotipos de Adenovírus (NWANEGBO et al., 2007).

Considerando ainda os mecanismos inatos de defesa locais, a mucina secretada pelas células caliciformes inibe a adesão de micróbios no epitélio da conjuntiva e da córnea (RYU et al., 2010). O próprio epitélio é uma barreira mecânica contra a invasão

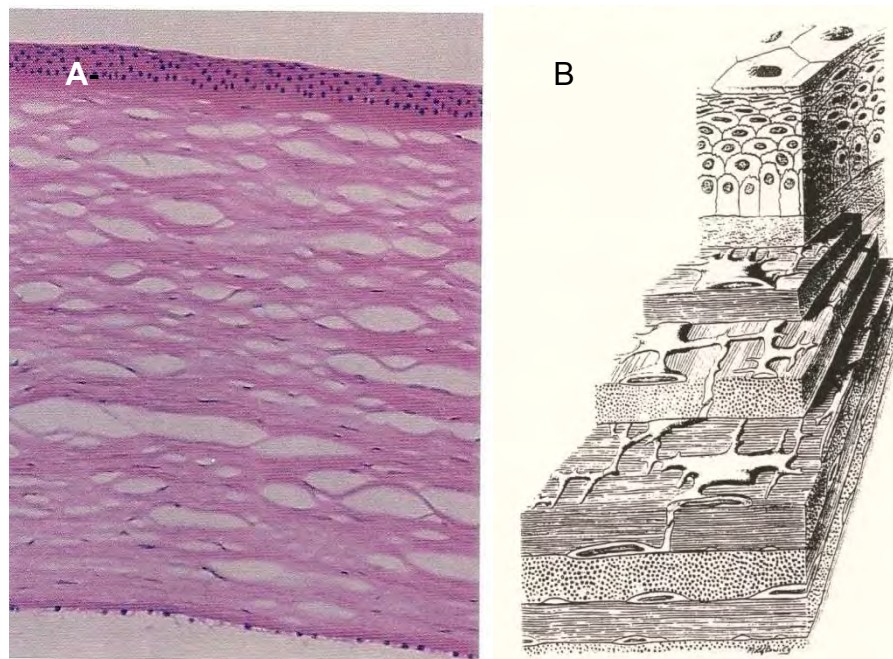
de microrganismos. A mucosa conjuntival tem um completo conjunto de células imunologicamente competentes (GOMES et al., 2007; SMOLIN, 1985). O epitélio conjuntival não infectado possui linfócitos citotóxicos, linfócitos T- regulatórios e células de Langerhans. Na substância própria da conjuntiva há linfócitos T auxiliares e células CD8. Células Natural Killer, mastócitos, linfócitos B, plasmócitos, macrófagos e ocasionalmente polimorfonucleares também estão presentes (ALLANSIMITH et al., 1978). O tecido linfoide associado à mucosa fica sob o epitélio conjuntival; os linfócitos distribuem-se difusamente, agrupando-se nos folículos conjuntivais (KNOP; KNOP, 2005). Os folículos conjuntivais são nódulos subepiteliais organizados de linfócitos B e têm em suas imediações linfócitos T e outras células imunes; esses ficam tipicamente no fórnix conjuntival, nas regiões perilimbicas e tarsais e a sua hiperplasia é evidenciada clinicamente nas reações foliculares secundárias a hiperplasia local nas infecções virais e por *Chlamidia* (CHODOSH et al., 2005). Durante uma resposta imune, os canais vasculares e linfáticos da conjuntiva, assim como em outros tecidos, transportam componentes humorais, celulares e fatores mediadores inflamatórios, o que promove a dilatação vascular, aumenta a permeabilidade e favorece a diapedese através dos vasos conjuntivais (GOMES, 1997).



Fonte: Adaptado de Knop e Knop (2005).

Figura 2 - Distribuição do tecido linfoide na conjuntiva e pálpebra: A (esquema de localização dos folículos) e B (corte histológico da conjuntiva bulbar).

A córnea, por sua vez, quando saudável é classicamente desprovida de leucócitos; entretanto, células de Langerhans ativadas e outras células dendríticas normalmente estão presentes na periferia do epitélio corneano, podendo migrar rapidamente para o centro da córnea em resposta a um agente agressor (BRUDER; KOVESDI, 1997). Segundo Gordon et al. (1992), as células constitutivas do estroma corneano, os chamados ceratócitos, semelhantes aos fibroblastos do tecido conjuntivo denso organizado, na infecção, aumentam a cascata inflamatória pela secreção de citocinas pró-inflamatórias. Com isto, os linfócitos e neutrófilos são recrutados para a córnea através do filme lacrimal dos vasos da arcada límbica e também do humor aquoso. Esse recrutamento imune é essencial para a defesa do tecido corneano frente a uma infecção na córnea, a ceratite.



Fonte: Adaptado de Basic and Clinical Science Course of the American Academy.

Figura 3 - Córnea: A (córnea em corte histológico) e B (esquema das camadas da córnea).

A resposta imune natural da mucosa conjuntival e da córnea, combinada com o rápido ciclo das células epiteliais, ajuda na remoção de microrganismos e na proteção contra a invasão tecidual, sendo a lágrima de grande importância nessa defesa (KNOP; KNOP, 2005). Na resposta imune adquirida específica, células apresentadoras de

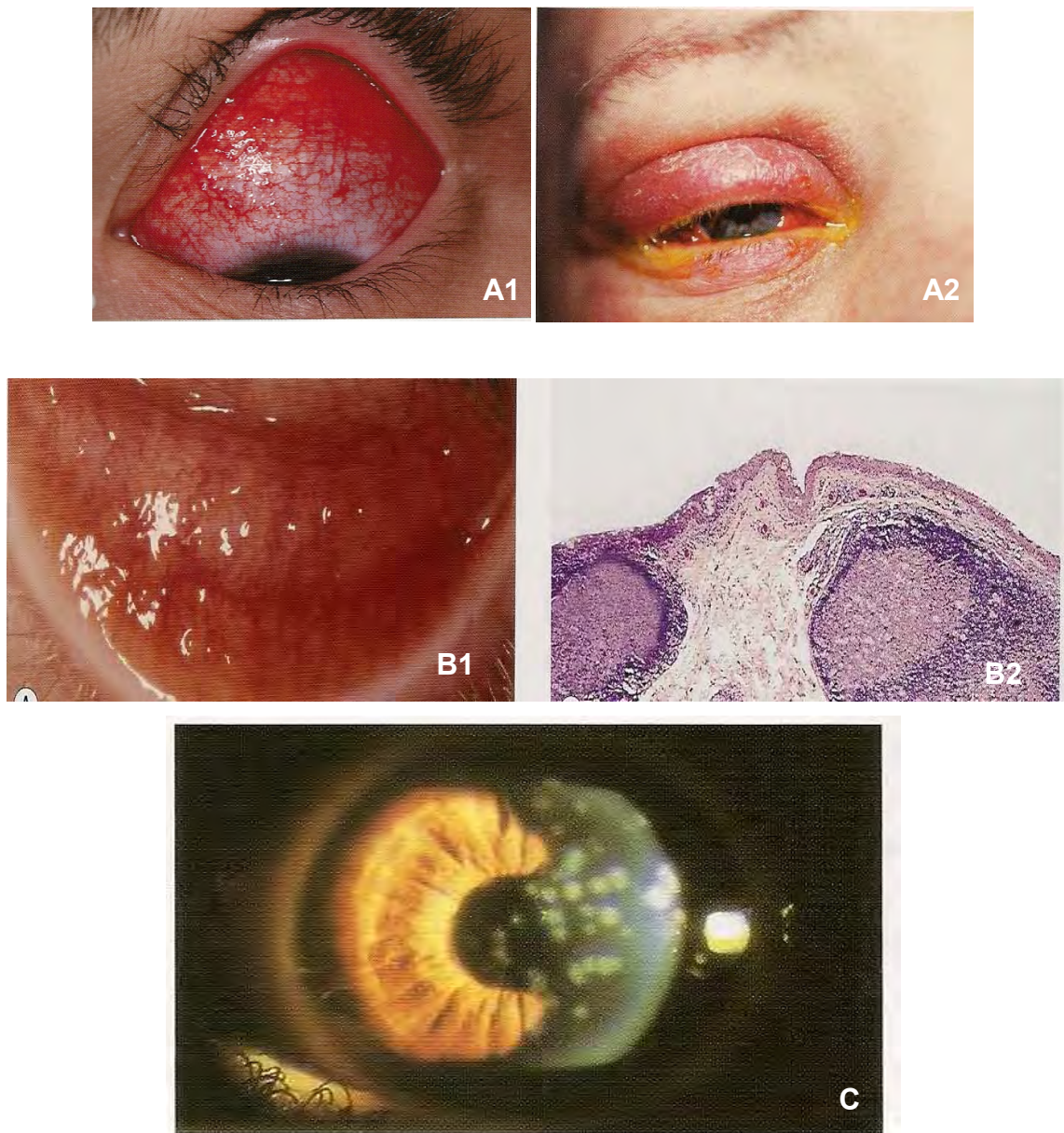
antígeno, como as de Langerhans e os macrófagos teciduais levam antígenos processados aos nódulos linfoides mucosos e aos linfonodos regionais (REDFERN; McDERMOTT, 2010). Hingorani e colaboradores (1997) relataram que essas células estão presentes em grande quantidade no epitélio corneano, no epitélio conjuntival e no estroma. Em resposta à invasão microbiana, células da superfície ocular secretam IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias e levam à migração de células imunes como macrófagos, linfócitos e neutrófilos a aderirem aos vasos locais e serem ativadas no tecido (ALLANSIMITH et al., 1978).

A infecção da superfície ocular pode ocorrer por contato direto ambiental com exposição à fômites, mãos contaminadas ou partículas dispersas no ar; por via hematogênia, sendo mais rara pela passagem transplacentária; e por extensão de processos infecciosos contínuos dos anexos oculares como as pálpebras e o trato respiratório superior via ducto nasolacrimal (KANSKI, 2011; KOO et al., 1989). Vários microrganismos podem causar conjuntivite e ceratite. As bactérias e os vírus são agentes comumente envolvidos nas conjuntivites. Dentre os vírus estão *Herpes virus*, *Coxsackievirus*, *Rhinovirus*, *Echovirus*, *Enterovirus* *Molluscum contagiosum* vírus etc. e, frequentemente, os Adenovírus (KANSKI, 2011; VINEY et al., 2008).

Conforme está descrito nos estudos de Aoki e Tagawa (2002), realizados no Japão, em Sapporo, os Adenovírus foram responsáveis por 15 a 70% dos casos de conjuntivite durante um período de 21 anos. A evolução da infecção depende de o microrganismo aderir, escapar das defesas naturais, invadir e replicar e, em algumas circunstâncias, permanecer no tecido.

As conjuntivites virais caracterizam-se por hiperemia conjuntival, lacrimejamento com secreção aquosa, reação folicular, desconforto, irritação e prurido ocular, inchaço conjuntival (quemose) e palpebral. Já a conjuntivite adenoviral pode iniciar-se com lacrimejamento copioso, hiperemia conjuntival, inchaço local e, às vezes, linfadenopatia pré-auricular e submandibular satélite. O período de evolução dessa infecção é de três a quatro semanas, sendo o quadro progressivo nos primeiros sete a 10 dias. Após o 10º dia, quando começa haver melhora dos sintomas em algumas pessoas, surgem infiltrados numulares na córnea; essa ceratite segue com aumento progressivo da densidade desses infiltrados. Os infiltrados subepiteliais surgem em 20 a 80% dos pacientes infectados com Adenovírus (AOKI et al., 2011). Gordon et al. (1992) verificaram que as células iniciais que infiltraram a córnea eram neutrófilos, havendo, entretanto, a presença de monócitos. Em quadros de inflamação mais severa, observa-se

a formação de membranas sobre as conjuntivas palpebrais inferiores e superiores, muitas vezes acompanhadas de feridas secundárias na córnea, promovidas pelo seu efeito de corpo estranho. Nessas membranas são predominantes os neutrófilos (HAMMER et al., 1990; LAIBSON; GREEN, 1970).



Fonte: Adaptado de Kansky (2010).

Figura 4 - Sintomas de conjuntivite: A (hiperemia conjuntival e pálpebra), B (reação folicular) e C (infiltrados numulares).

A maioria das doenças oculares secundárias à infecção pelo Adenovírus apresenta-se como conjuntivite folicular simples tal ceratoconjuntivite epidêmica ou febre faringoconjuntival. A conjuntivite folicular simples é autolimitada, transitória e não associada a doenças sistêmicas; o paciente em geral recupera-se bem, mesmo sem procurar a assistência médica (WEBER; EICHENBAUM, 1997). A febre faringoconjuntival, que é mais comumente causada pelos sorotipos 3 e 7 do Adenovírus, caracteriza-se por febre, dor de cabeça, faringite, conjuntivite folicular e adenopatia pré-auricular; em algumas vezes os sinais sistêmicos podem mimetizar a infecção por influenza (WEIIS, 1994; BELL et al., 1955). Já a ceratoconjuntivite epidêmica é usualmente causada pelos sorotipos 8, 19 e 37 do subgrupo D e está associada ao envolvimento corneano significativo; sendo bilateral na maioria das pessoas e precedida por infecção do trato respiratório superior. Uma semana a 10 dias, após inoculação, uma conjuntivite forte com reação folicular desenvolve-se, associada com ceratite puntata. A reação conjuntival folicular é obscurecida pela quemose conjuntival intensa e pelas hemorragias petequiais; ocasionalmente, podem ocorrer grandes hemorragias subconjuntivais. A adenopatia pré-auricular é proeminente e pseudomembranas ou membranas verdadeiras ocorrem predominantemente na conjuntiva tarsal. Entre sete e 14 dias, após o início da conjuntivite, iniciam-se infiltrados multifocais subepiteliais no estroma anterior da córnea, que causam fotofobia e redução visual. Esses infiltrados podem persistir por meses seguidos. A ceratite ocorre pela replicação do vírus no epitélio corneano; os infiltrados subepiteliais são secundários à resposta imunopatológica secundária à infecção viral dos ceratócitos no estroma anterior (ROBINSON et al., 2008) e pelo reconhecimento de padrão de antígenos (*PAMPs*), comuns à resposta inata a proteínas capsídeais no tecido corneano e nos ceratócitos (CHINTAKUNTLAWAR et al., 2010).

1.2. Adenovírus

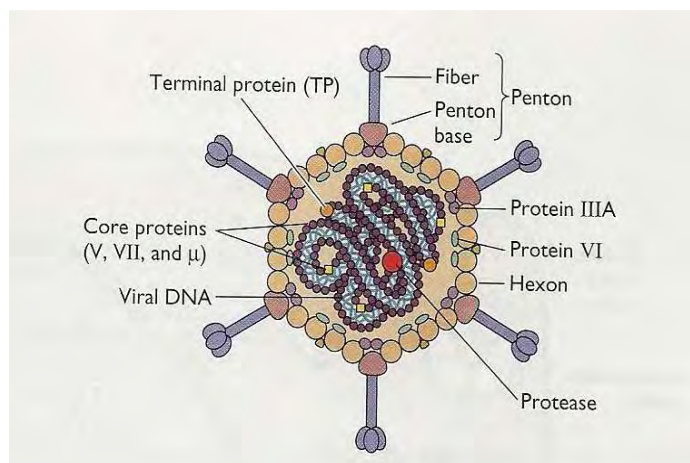
Em 1953, Rowe e colaboradores, procurando o agente etiológico da infecção respiratória aguda, observaram efeito citopático com degeneração espontânea de uma cultura celular primária derivada de tecido da adenoide humana. No ano de 1954, Hilleman e Wener isolaram, nas secreções respiratórias de recrutas das forças armadas, um agente que também causava efeito citopático em cultura celular humana, durante uma epidemia de doença respiratória; em 1956, esse foi denominado Adenovírus

(ENDERS et al., 1956). O vírus é associado à infecção aguda do trato respiratório (ABBONDANZO et al., 1989), conjuntivite, meningoencefalite, cistite hemorrágica, diarreia em crianças (YOLKEN et al., 1982), falência hepática com imunocomprometidos, assim como pneumonias fatais em neonatos (FIELDS, 2007).

No estudo de Cheng et al. (2008), o Adenovírus foi, em crianças, causa frequente de tonsilite, bronquite e bronquiolite, febre faringoconjuntival, conjuntivite e otite média aguda, sendo nesse estudo o sorotipo 3 encontrado em 80% dos casos. O Adenovírus também pode estar relacionado a casos de obesidade, segundo Arnold et al. (2010). Em 1962, Trentim et al. descobriram que o Adenovírus induzia tumores malignos após sua inoculação em *hamsters* recém-nascidos, sendo então caracterizado como vírus oncogênico. Por meio de estudo em Adenovírus, descobriu-se, em 1977, a ocorrência de *splicing* do mRNA, sendo conferido a seus pesquisadores, Roberts e Sharp, o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, em 1993.

Atualmente, já foram identificados 56 membros do grupo dos Adenovírus, pertencentes à família *Adenoviridae*, que podem ser dos gêneros *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*, este último limitado a vírus que infectam aves. O *Mastadenovirus*, segundo Fieds (2007), compreendia 49 sorotipos de Adenovírus humano, assim como de outros mamíferos como símios, cavalos, porcos, cabras e cães.

Os vírions, descendentes de uma replicação viral completa, têm a forma icosaédrica, de 70 a 100 nm, contém DNA em cerca de 13% de sua massa, não possuem envoltório ou membrana lipídica, mas têm traços de carboidratos, em decorrência de as proteínas da *fiber* (fibra) serem glicosiladas, com adição de glicosamina. Além disso, esses têm 252 subunidades de capsômeros, com 240 hexons e 12 pentons; em cada penton forma-se uma base da qual se projeta uma fibra, cujo comprimento varia conforme o sorotipo (STEWART et al., 1993).



Fonte: Adaptado de Flint (2009).

Figura 5 - Esquema Adenovírus.

A classificação dos Adenovírus em grupos é baseada em reações de neutralização e de hemaglutinação (Tabela 1). Segundo Norby e colaboradores (1969), a neutralização tipo específica resulta da ligação de anticorpos a epítomos nas proteínas dos hexons capsídeos e na porção terminal em punho da proteína da fibra. Há regiões hipervariáveis nas alças externas das proteínas do hexon que agem como epítomos para reconhecimento dos anticorpos. Os sorotipos são distribuídos em seis grupos (A-F), com base na sua habilidade de aglutinar células vermelhas (propriedade do eixo da fibra). Atualmente, o sequenciamento genético também permite a classificação em grupos e a tipagem, caracterizando a genotipagem (TOOGOOD et al., 1992). Desses, o subgrupo D é fortemente associado com a ceratoconjuntivite epidêmica (KANSKY, 2011).

Fields (2007) descreve que o Adenovírus pode ser cultivado em cultura primária de células de rim embrionário humano (HEK), células A549 (derivadas de carcinoma de pulmão humano) e em linhagens de células contínuas como HEP-2, HeLa e KB. As linhagens de fibroblastos humanos são mais fáceis de manter por longo período, sem mudança de meio, mas são menos suscetíveis que as HEK. Células HEK transformadas com Adenovírus do sorotipo 5 (AdV-5), células 293, são células de linhagem contínua que retêm E1A e E1B do genoma do AdV-5 covalentemente ligado ao genoma de DNA hospedeiro, conforme salienta Flint (2009).

Tabela 1 - Classificação de Adenovírus humanos

| Subgrupo | Hemaglutinação | Sorotipo | Indução de tumores em animais | Transformação de cultura celular |
|----------|---|---|----------------------------------|----------------------------------|
| A | IV (pouco ou nenhuma aglutinação) | 12, 18, 31 | Alta | + |
| B | I (completa aglutinação de eritrócitos de macaco) | 3, 7, 11, 14,16, 21, 34, 35 | Moderada | + |
| C | III (aglutinação parcial de eritrócitos de ratos) | 1, 2, 5, 6 | Baixa ou nenhuma | + |
| D | II (completa aglutinação de eritrócitos de rato) | 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 36-39, 42-49 | Baixa ou nenhuma (tumor mamário) | + |
| E | III | 4 | Baixa ou nenhuma | + |
| F | III | 40, 41 | Desconhecida | + |

Fonte: Adaptado de Fields (2007).

Estudos sobre ciclo replicativo do Adenovírus foram feitos com Adv 2 e Adv 5. Esse ciclo é dividido por convenção em duas fases, que são separadas pelo início da replicação de DNA. Os eventos precoces iniciam-se quando os vírus interagem com a célula hospedeira, incluindo adsorção, penetração, movimentação do DNA viral para dentro do núcleo e expressão do conjunto de genes precoces. Os produtos dos genes precoces medeiam a replicação do DNA, induzem a progressão do ciclo celular para fase S, bloqueiam a apoptose e antagonizam uma variedade de medidas antivirais da célula hospedeira. A fase precoce dura de cinco a seis horas em células HeLa. A fase tardia inicia-se com a replicação do DNA, seguida da expressão de genes tardios e montagem do vírion, complementando o ciclo em 20 a 24 horas. Ao fim do ciclo, formam-se 10^4 vírions por célula com excesso de proteínas virais e de DNA não montados nos virions.

Segundo Fields (2007), ao ocorrer a formação adequada do virion, com o correto encapsidamento do DNA viral, a progênie viral é liberada sob destruição da célula hospedeira por mecanismos desconhecidos, com rompimento dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular.

1.3. PCR como auxílio diagnóstico

A reação de polimerase em cadeia (PCR) desenvolvida por Kare Mullis, em 1986, possibilita dentro de um tubo eppendorf amplificar uma sequência desejada de DNA, desde que se conheçam os *locus* de anelamento de oligonucleotídeos denominado *primers*, que agindo como iniciadores permitem a amplificação da sequência desejada do DNA pela ação da DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*. A DNA polimerase dessa bactéria (Taq DNA Polimerase) polimeriza a cadeia de DNA em altas temperaturas, adicionando desoxirribonucleotídeos a uma cadeia com extremidade 3'OH livre (GIBBS et al., 2009). A enzima Taq DNA polimerase não tem capacidade de *proofreading* como a DNA polimerase celular. Em razão disso, polimeriza com taxa de erro mais elevada que a DNA polimerase humano, cometendo cerca de um erro a cada 9 mil nucleotídeos adicionados, enquanto o DNA polimerase humano comete um erro a cada 10^9 nucleotídeos (ECKERT et al., 1991). Na presença de Taq DNA polimerase, de desoxinucleotídeos, de tampão e de *primers*, a reação é realizada com aquecimento das amostras misturadas aos reagentes, a 94°C. Nessa temperatura, há desnaturação da dupla fita de DNA; a seguir, a mistura é resfriada para 50 a 60°C para

que haja anelamento em excesso dos oligonucleotídeos, *primers*, no tubo de reação, a fim de se ligarem às moléculas de DNA nas posições específicas. Posteriormente, a temperatura é elevada novamente a 72°C para que a Taq DNA polimerase, ao se aderir à extremidade dos *primers*, inicie a síntese de novas fitas complementares às moléculas de DNA molde em sua temperatura ótima (RYCHILIK et al., 1990). Sucessivamente, a mistura é submetida a novos ciclos de aquecimento a 94°C, resfriamento a 50-60°C e a novo aquecimento a 72°C, para alongamento da fita. Após vários ciclos, cerca de 30, têm-se 130 milhões de cópia da molécula de DNA molde (MULLIS, 1990).

A quantidade de DNA molde pode ser bem pequena por causa da alta sensibilidade da reação. A sequência-alvo a ser amplificada deve estar numa concentração de ao menos 1 fmolar (SAIKI et al., 1988; SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Inicialmente, os produtos da amplificação são longos, com polinucleotídeos com porção 5' final idêntica, mas com terminais 3' aleatórios, posição essa em que a síntese de DNA terminou ao acaso. Com a repetição dos ciclos de desnaturação, anelamento e síntese, os produtos longos são desnaturados e servem como molde, gerando em ciclos mais tardios produtos curtos com terminações 5' e 3' ajustadas com as posições de anelamento dos *primers*. Esses produtos curtos acumulam-se progressivamente de modo exponencial; conseqüentemente, microgramas originaram-se de nanogramas ou menos de DNA (WITNEY et al., 2004). Segundo Brown (2010), o tamanho do *primer* é fundamental, pois quando são muito curtos podem se hibridizar fora da sequência desejada, ocorrendo anelamento inespecífico. Se, no entanto, o *primer* for muito longo, o anelamento é mais difícil e por isto os maiores que 30 nucleotídeos não funcionam bem (VanGUILDER et al., 2008). Um *primer* com comprimento de 17 nucleotídeos tem a chance esperada de anelamento específico por análise de combinação de uma vez por genoma humano; portanto, o tamanho próximo do ideal é de 17 a 28 nucleotídeos (BROWN, 2010). A fim de evitar o anelamento inespecífico, além do tamanho do *primer*, é importante a temperatura de anelamento. Temperaturas mais baixas podem permitir o anelamento inespecífico. A temperatura mais apropriada pode ser calculada com base na temperatura de *melting* ou (T_M) do híbrido *primer*-molde de DNA. A T_M é a temperatura na qual o híbrido se dissocia (*melts*). Uma temperatura 1-2°C abaixo a essa deve ser suficiente para permitir que o correto híbrido *primer*-molde de DNA se forme (PALOV et al., 2004).

O resultado de amplificação do PCR é checado submetendo o produto do PCR à eletroforese em gel de agarose. A porção amplicada ou *amplicon* pode ser visível após

coloração por brometo de etídeo dentro de outros métodos de identificação de DNA. (SAMBROOK, 2006). Se a quantidade esperada é pequena, o gel pode ser revelado por *Southern* hibridização (ALBERTS, 2008). Em alguns casos, na necessidade de informações adicionais sobre as bandas amplificadas, podem ser realizados estudos subsequentes como pesquisa de locais de restrição, sequenciamento e clonagem (BROWN, 2010).

Neste trabalho escolheu-se a técnica de PCR como forma de diagnóstico em razão da alta sensibilidade e especificidade do método no diagnóstico.

1.4. Objetivo

Definir a prevalência do Adenovírus como agente etiológico da conjuntivite nos anos de 2009 e 2010 em uma clínica médica oftalmológica especializada em Viçosa, MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras clínicas

As amostras foram coletadas de pacientes com conjuntivite, após autorização desses ou de seus responsáveis, mantendo o sigilo da relação médico-paciente, de acordo com a regulamentação do Ministério da Saúde 196/96, após explicação da natureza do estudo para diagnóstico da prevalência do Adenovírus como agente de conjuntivite. A coleta foi feita em clínica oftalmológica especializada em Viçosa, Minas Gerais, de maio de 2009 a janeiro de 2011.

Foram coletadas amostras da secreção conjuntival por *swab*, com auxílio de esponja estéril, sob orientação de microscopia anterior em lâmpada de fenda (Topcon 3E) de 91 pacientes com conjuntivite. O material coletado foi colocado dentro de eppendorf, previamente identificado. Os eppendorfs de 1,5 mL de capacidade estavam cheios com 250 µL de PBS, como meio de acondicionamento para congelamento em freezer. Após a coleta, as amostras foram imediatamente guardadas em freezer, no próprio consultório; posteriormente, levadas ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Viçosa; e acondicionadas a -20°C até o estudo de PCR, após extração de DNA.

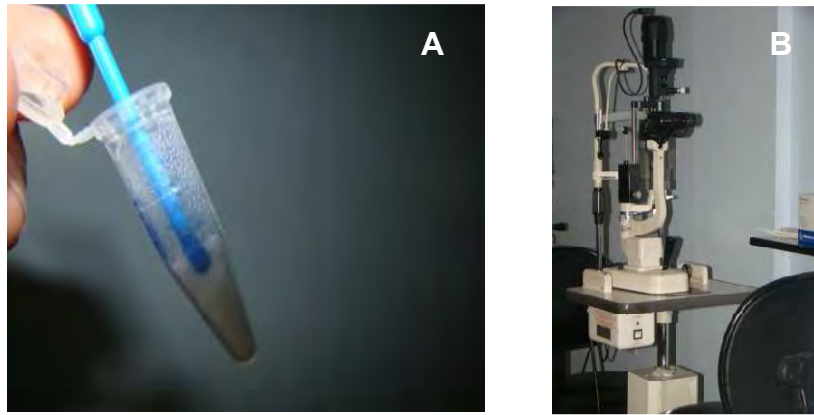


Figura 6 - Método de coleta: A (amostra da secreção e swab, sendo depositada em Eppendorf com PBS) e B (lâmpada de fenda Topcon 3E usada no procedimento).

Foram coletadas amostras de pacientes que estavam com sintomas de conjuntivite viral. Os sintomas indicativos foram olhos hiperemiados, secreção aquosa e desconforto. Os sintomas sugestivos da etiologia adenoviral, considerados como clinicamente positivos por estarem com Adenovírus, foram hiperemia conjuntival, lacrimejamento com secreção aquosa, reação folicular, linfonopatia satélite e ceratite com infiltrados numulares característicos.

2.2. Extração de DNA viral

As amostras foram submetidas à extração do DNA viral com kit específico para extração de RNA e DNA viral de alta sensibilidade, QIAamp UltraSens Virus (Quiagen), cedido gentilmente pelo professor Eduardo Honda. A extração foi realizada de acordo com protocolo do fabricante; o DNA purificado foi eluído em 20 μ L de água e armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.3. Amplificação por PCR

O DNA purificado das 91 amostras foi submetido a PCR com uso de *primers* degenerados (*upstream e downstream*) para amplificar parte da proteína II do *Hexon* (amplificação da banda de 301 pb). Esses *primers* genéricos degenerados são sensíveis a múltiplos sorotipos de Adenovírus. O *primer upstream* foi o hex1deg (5'-GCC

(C,G)CA (A,G)TG G(G,T)C (A,T)TA CAT GCA CAT C-3') de 25 nucleotídeos e o *downstream*, de 21 nucleotídeos, foi hex2deg (5'-CAG CAC (C,G)CC (A,T,C,G)CG (A,G)AT GTC AAA-3'). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf e o produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red UniScience (1 µg/mL), sendo o marcador molecular padrão M Read-load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, LT). A preparação da mistura para as reações de PCR em aparelho termociclador foi realizada, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - PCR Master Mix: preparo para 100 reações

| Mistura do <i>PCR</i> | |
|----------------------------------|---------|
| Master Mix (Promega) | 1250 µL |
| <i>Primer upstream</i> 10 µM | 250 µL |
| <i>Primer downstream</i> 10 µM | 250 µL |
| H ₂ O (nuclease free) | 250 µL |
| 1 reação | |
| Aliquota de 20 µL da mistura | |
| 5 µL a amostra de DNA purificado | |



Figura 7 - Equipamentos usados: A (mix feito em capela de fluxo) e B (reação feita em termociclador Eppendorf no Laboratório de Imunovirologia).

O programa para amplificação seguiu as seguintes etapas: desnaturação a 94°C, anelamento a 55°C, síntese a 72°C, em 30 ciclos, seguido de um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos (SAMBROCK; RUSSEL, 2006).

Após reação, uma alíquota de 10 µL do produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e sob voltagem de 60 mV por cerca de 1,5 h com revelação em câmara de irradiação UV e fotodocumentação digital.



Figura 8 - Câmara de UV para revelação do Gel em UV, gel Red.

2.4. Sequenciamento

Onze amostras PCR positivas selecionadas ao acaso foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa, a fim de se determinar qual sorotipo era responsável pela infecção.

3. RESULTADOS

Noventa e uma amostras foram submetidas a PCR e à presença do amplicon de 301 pb, correspondente à amplificação de parte do gene da proteína II do *Hexon* capsideal, foi a evidência da presença do Adenovírus. As fotografias dos géis estão nas Figuras 9 a 16.

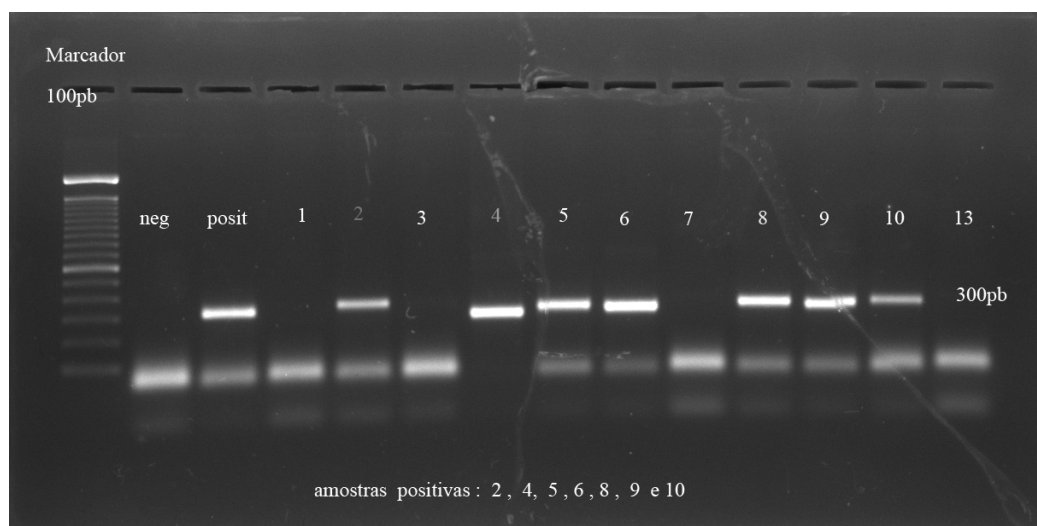


Figura 9 - Eletroforese das amostras de 1 a 13, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo).

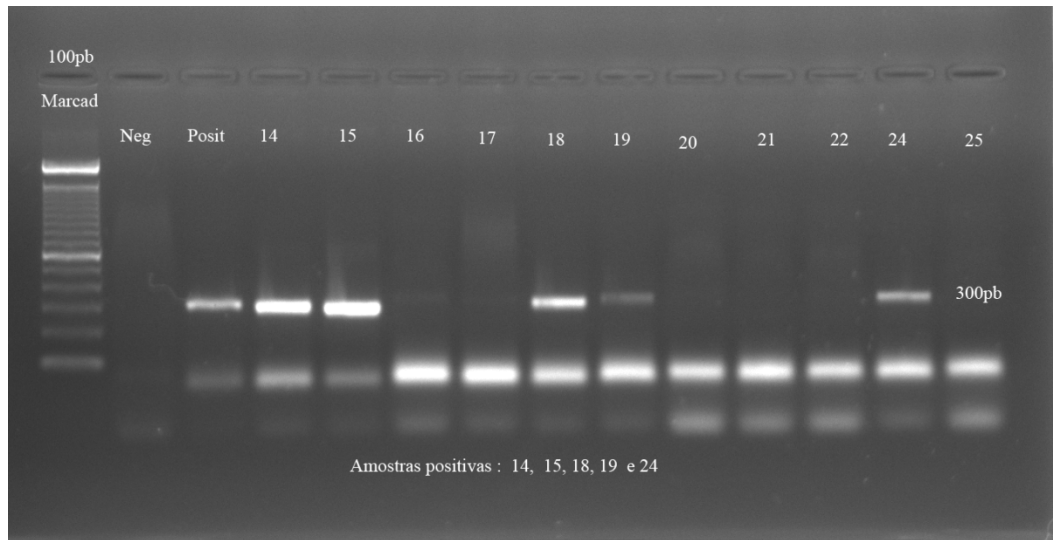


Figura 10 - Eletroforese das amostras de 14 a 25, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (Neg = controle negativo, Posit = controle positivo).

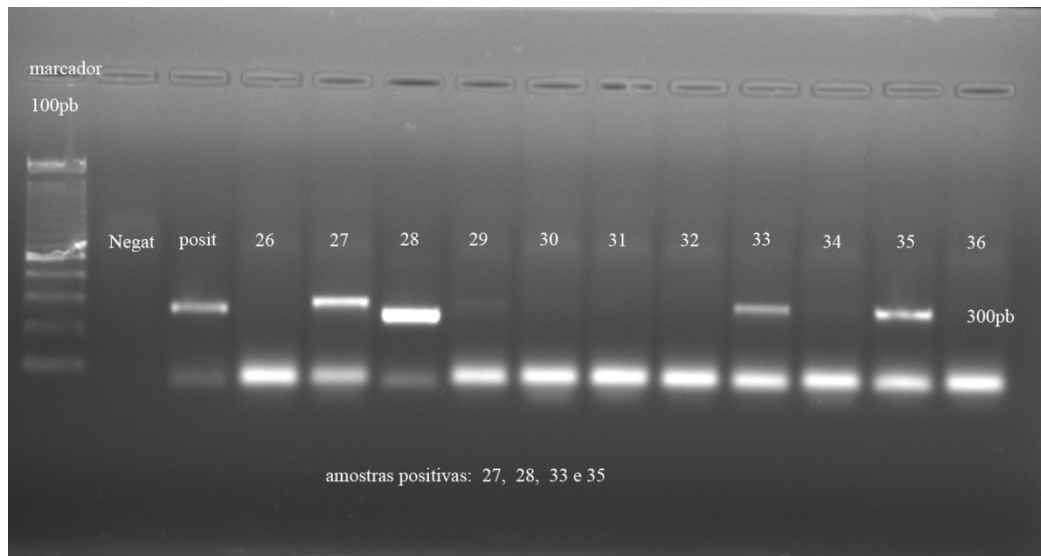


Figura 11 - Eletroforese das amostras de 26 a 36, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (Neg = controle negativo, Posit = controle positivo).

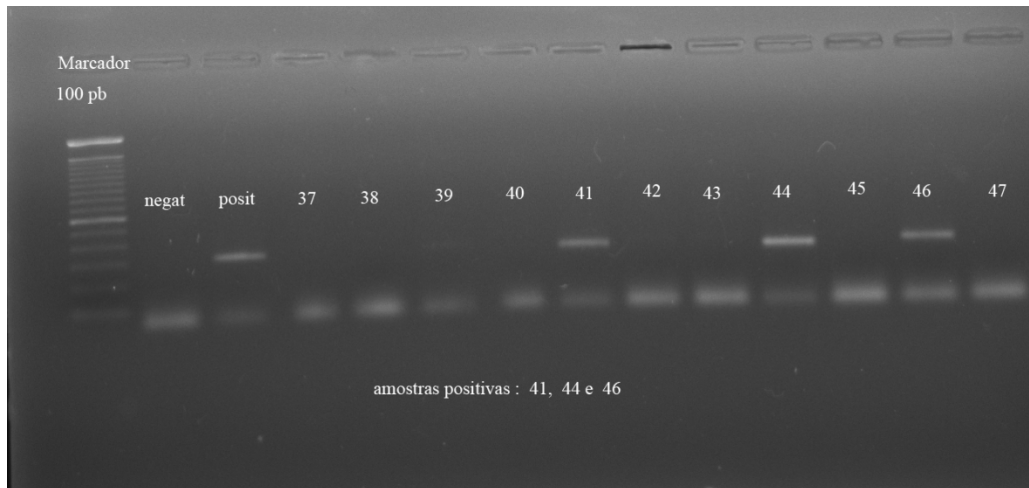


Figura 12 - Eletroforese das amostras de 37 a 47, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo).

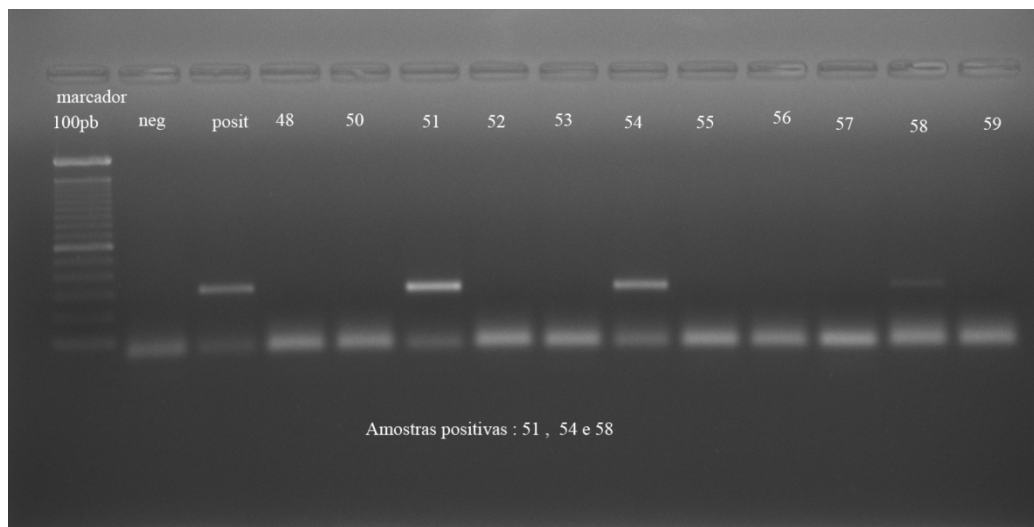


Figura 13 - Eletroforese das amostras de 48 a 59, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, Posit = controle positivo).

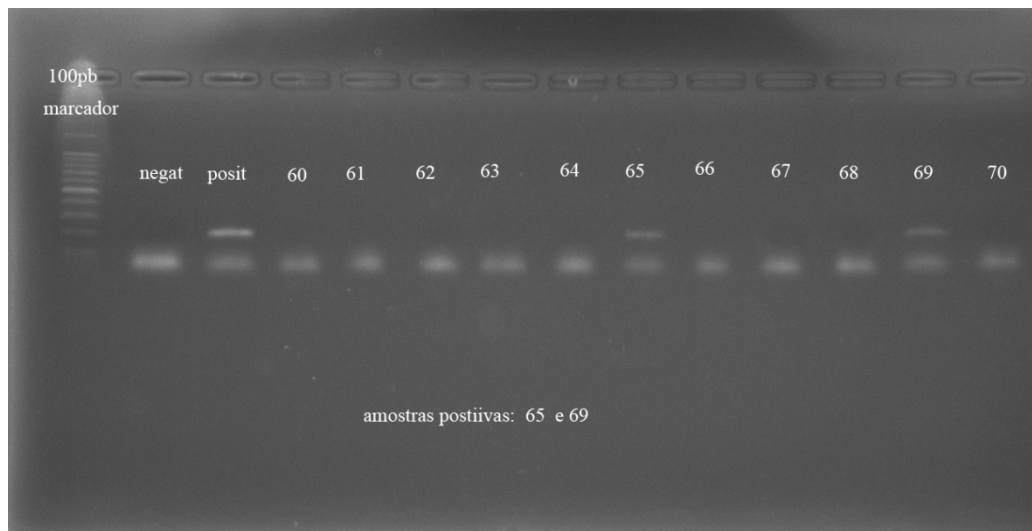


Figura 14 - Eletroforese das amostras de 60 a 70, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo).

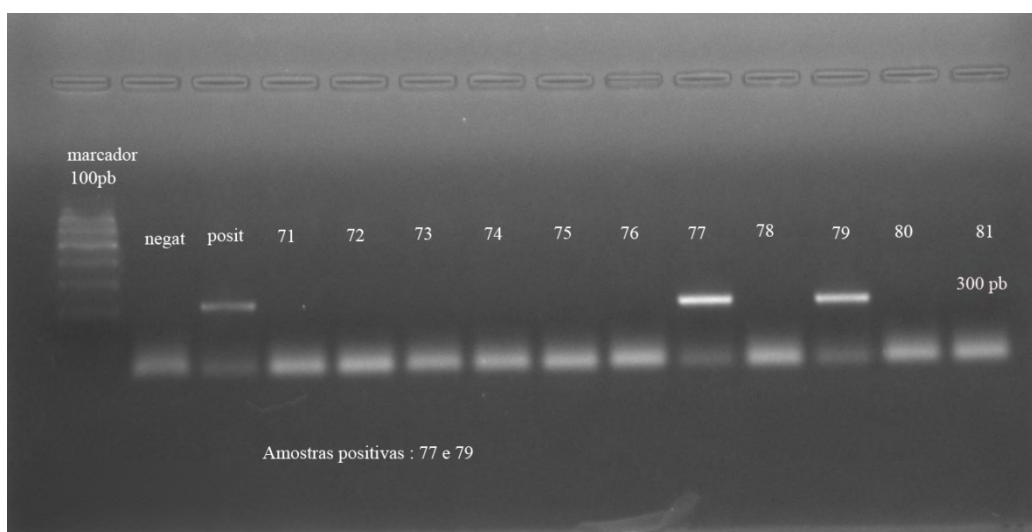


Figura 15 - Eletroforese das amostras de 71 a 81, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, Posit = controle positivo).

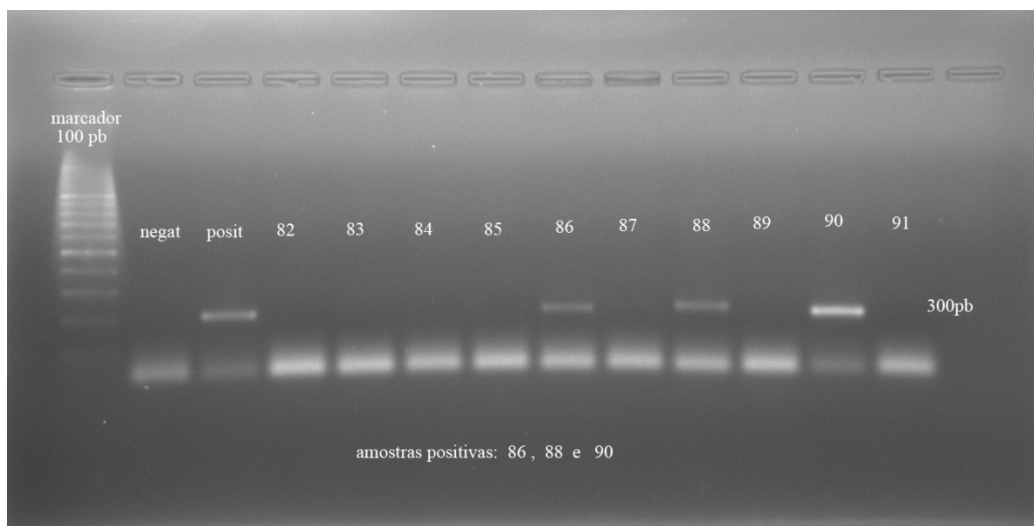


Figura 16 - Eletroforese das amostras de 82 a 91, com aplicação de 10 μ L do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red e fotografado sob UV. (neg = controle negativo, posit = controle positivo).

Os resultados dos géis quanto à presença do amplicon de 301 pb estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo dos dados de PCR

| Amostras positivas | Amostras negativas |
|--|---|
| 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11,12,14, 15, 18,19, 23, 24, 27, 28, 33, 35, 41, 44, 46, 49, 51, 54, 58, 65, 69, 77, 79, 86, 88 e 90 | 1, 3, 7,13, 16, 17, 20, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 50, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 89, 91 |

Obs.: as amostras 11, 12, 23 e 49 foram separadas para estudo de filogenia.

Onze amostras das 33 positivas tiveram o amplicon delas isolado e submetido a sequenciamento. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de similaridade de 11 amostras PCR + para Adenovirus submetidas a sequenciamento

| Identificação da amostra | Resultado do sequenciamento no BLAST Sorotipo |
|--------------------------|---|
| Amostra 6 | Adenovirus humano B |
| Amostra 14 | Adenovirus humano 34 (B) |
| Amostra 15 | Adenovirus Humano 8 (D) |
| Amostra 28 | Adenovirus Humano 4 (E) |
| Amostra 41 | Adenovirus Humano 3 (B) |
| Amostra 44 | Adenovirus Humano 4 (E) |
| Amostra 51 | Adenovirus Humano 8 (D) |
| Amostra 65 | Adenovirus Humano 8 (D) |
| Amostra 69 | Adenovirus Humano 4 (E) |
| Amostra 77 | Adenovirus Humano 7 (B) |
| Amostra 79 | Adenovirus Humano 7 (B) |

3.1. Estudos das amostras de conjuntivite viral

Analisando as amostras, observou-se que, dos 91 quadros de conjuntivite que foram incluídos no estudo, 46,15% foram sugestivos de conjuntivite por Adenovirus e 36,3% das conjuntivites virais foram positivas para o Adenovirus com a técnica de PCR com uso de *primer* degenerado e extração de DNA das amostras congeladas (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise das amostras

| Amostras testadas | Casos clinicamente sugestivos | Casos confirmados por PCR |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 91 | 42 (46,15%) | 33 (36,35%) |

Na avaliação da distribuição das amostras por idade, observou-se que houve maior prevalência em adultos da faixa etária de 26 a 65 anos. Na Figura 17, são apresentadas que 4,40% das amostras foram provenientes de lactentes; 7,69%, de crianças; 13,19%, de adolescentes; 10,99%, de adultos jovens; 60,44%, de adultos; e 3,30%, de idosos.

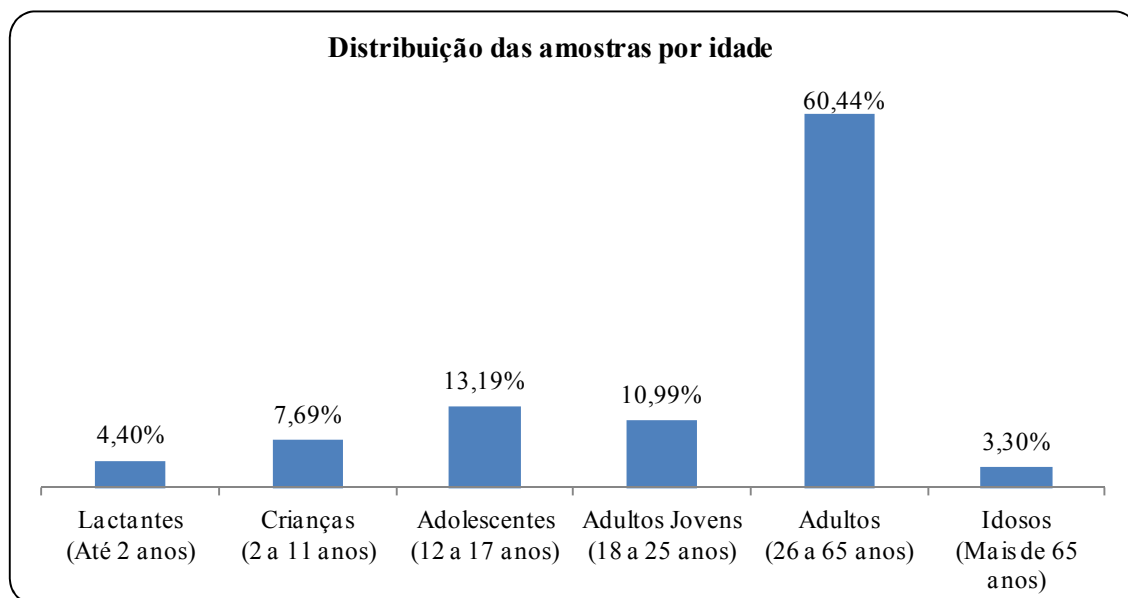


Figura 17 - Distribuição das amostras por idade.

De acordo com a Tabela 6, a média de idade das amostras foi de 30 anos.

Tabela 6 - Estatística descritiva das idades das pessoas que compõem as amostras

| Amostra | N | Mín. | Máx. | Média | Desvio-padrão |
|---------|----|------|------|-------|---------------|
| Idade | 91 | 1 | 74 | 30,61 | 17,58 |

A distribuição das amostras em relação a sexo evidenciou que 55,17% eram provenientes de mulheres e 45,83%, de homens (Figura 18).

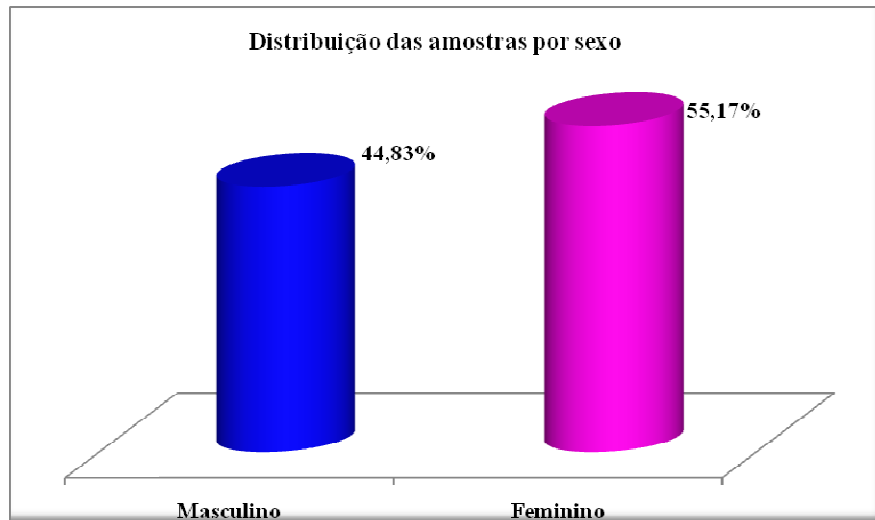


Figura 18 - Distribuição das amostras por sexo.

A fim de avaliar a distribuição dos casos entre maio de 2009 até o início de fevereiro de 2011, evidenciou-se que houve maior ocorrência de casos de conjuntivite em maio e junho de 2009 e em fevereiro, outubro, novembro e dezembro de 2010, quando ocorreram surtos de conjuntivite, sendo muitos casos clinicamente suspeitos de Adenovírus (Figura 19).

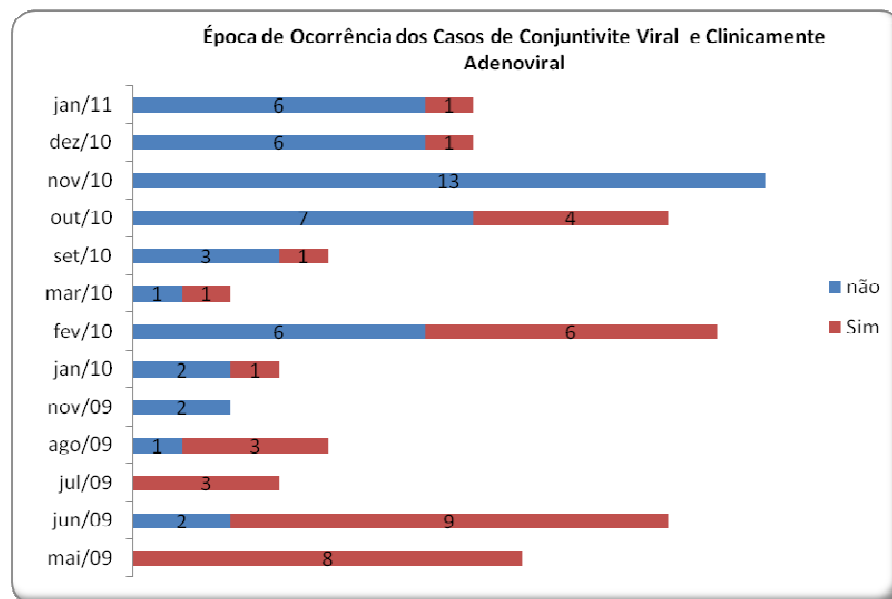


Figura 19 - Época de ocorrência dos casos de conjuntivite viral e clinicamente adenoviral.

A análise por PCR das amostras revelou que boa parte dos casos de conjuntivite viral era causada pelo Adenovírus, principalmente os surtos ocorridos em maio e junho de 2009 e fevereiro de 2010 (Figura 20).

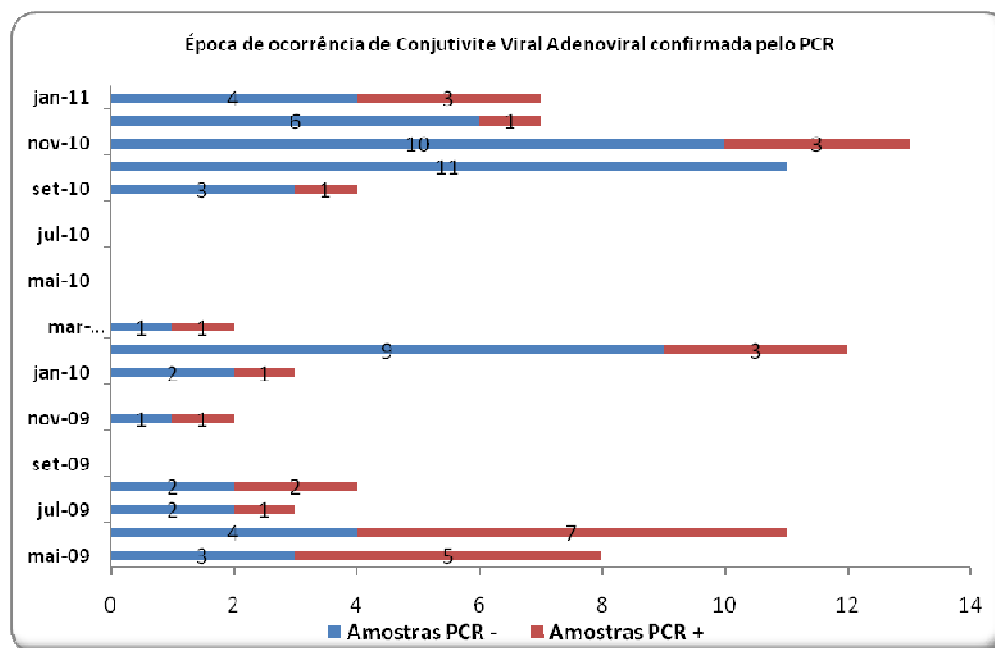


Figura 20 - Época de ocorrência de conjuntivite viral e conjuntivite adenoviral confirmada por PCR.

De acordo com a Tabela 7, ficou evidenciado que 46,15% (42) dos casos de conjuntivite eram suspeitos de ser adenoviral e 36,3% (33), PCR (Tabela 8).

Tabela 7 - Frequência de conjuntivite clinicamente adenoviral

| Adenoviral clinicamente | Número de casos | % |
|-------------------------|-----------------|--------|
| Sim | 42 | 46,15 |
| Não | 49 | 53,85 |
| Total – Amostra | 91 | 100,00 |

Tabela 8 - Frequência de conjuntivite adenoviral nas amostras confirmada por PCR

| PCR | Frequência | % |
|--------------|------------|--------|
| Positivo (+) | 33 | 36,30 |
| Negativo (-) | 58 | 64,70 |
| Total | 91 | 100,00 |

Comparando o diagnóstico de conjuntivite clinicamente adenoviral com o por PCR, observou-se que 54,76% dos casos clinicamente diagnosticados como adenoviral foram confirmados por PCR e 20,4% dos tidos como não adenoviral foram positivos ao PCR (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação da ocorrência do quadro clinicamente positivo com os resultados do PCR

| Adenoviral clinicamente | Positivo (+) | Negativo (-) | Total |
|-------------------------|--------------|--------------|-----------|
| Sim | 23 (54,76%) | 19 (45,24%) | 42 (100%) |
| Não | 10 (20,4%) | 39 (79,6%) | 49 (100%) |
| Total | 33 | 58 | 87 |

Ao avaliar o tempo médio de evolução do grupo clinicamente positivo com o grupo PCR+ para Adenovírus na Tabela 10, observou-se que 23 pacientes foram clinicamente positiva e PCR+. Estes pacientes desenvolveram conjuntivite por um tempo médio de três semanas. Já o grupo clinicamente negativo e PCR- teve conjuntivite por uma média de tempo de 1,54 semana.

Tabela 10 - Estatística descritiva do tempo médio de evolução

| Adenoviral clinicamente | PCR | N | Mínima | Máxima | Média | Desvio-padrão |
|-------------------------|--|----|--------|--------|-------|---------------|
| Sim | Positivo (+) Tempo de evolução ^a | 23 | 2 | 4 | 3,17 | 0,79 |
| | Negativo (-) Tempo de evolução | 19 | 1 | 4 | 3,06 | 0,73 |
| Não | Positivo (+) Tempo de evolução | 10 | 1 | 3 | 1,85 | 0,88 |
| | Negativo (-) Tempo de evolução | 39 | 1 | 3 | 1,54 | 0,65 |

^a semanas.

Nos casos clinicamente positivos confirmados por PCR, os sintomas clínicos caracterizaram-se por hiperemia ocular (93,10%); lacrimejamento (93,10%); secreção aquosa (93,10%); linfadenopatia satélite (62%); e quemose conjuntival (79,31%). A ceratite ocorreu em 72,41% dos pacientes clinicamente positivos e PCR+. Outros sintomas como o surgimento de membrana conjuntival estiveram presentes em 18,42% dos casos de suspeita de conjuntivite adenoviral e em 20,69% dos casos confirmados por PCR. A febre esteve presente em 17,24% e 48,28% dos casos também clinicamente sugestivos confirmados por PCR, conforme Tabela 11.

Os resultados do sequenciamento ainda não são conclusivos. O sequenciamento de 11 amostras positivas aleatórias revelou que o Adenovírus do grupo B e o D foram os mais frequentes, seguido do grupo E, sendo o HAdV-8 e o HAdV-4 os mais encontrados (Figuras 21 e 22).

Tabela 11 - Avaliação da frequência de sintomatologia

| Sintomas | Viral | % | Adenoviral clinicamente | % | Adenoviral PCR + | % |
|--|-------|-------|-------------------------|--------|------------------|-------|
| Hiperemia ocular | 86 | 98,85 | 38 | 100,00 | 27 | 93,10 |
| Lacrimejamento | 86 | 98,85 | 38 | 100,00 | 27 | 93,10 |
| Secreção serosa | 83 | 95,40 | 36 | 94,74 | 27 | 93,10 |
| Secreção purulenta | 4 | 4,60 | 2 | 5,26 | 1 | 3,45 |
| Linfadenopatia satélite | 34 | 39,08 | 21 | 55,26 | 18 | 62,07 |
| Quemose conjuntival | 48 | 55,17 | 29 | 76,32 | 23 | 79,31 |
| Membrana conjuntival | 10 | 11,49 | 7 | 18,42 | 6 | 20,69 |
| Hemorragia subconjuntival | | 0,00 | 6 | 15,79 | 6 | 20,69 |
| Desconforto | 50 | 57,47 | 18 | 47,37 | 13 | 44,83 |
| Dor moderada | 29 | 33,33 | 15 | 39,47 | 9 | 31,03 |
| Dor forte | 7 | 8,05 | 4 | 10,53 | 6 | 20,69 |
| Ferida na córnea secundária a membrana | 5 | 5,75 | 3 | 7,89 | 3 | 10,34 |
| Ceratite numular | 32 | 36,78 | 20 | 52,63 | 21 | 72,41 |
| Febre | 13 | 14,94 | 6 | 15,79 | 5 | 17,24 |
| Mal estar geral (dor no corpo) | 38 | 43,68 | 15 | 39,47 | 14 | 48,28 |
| Presença de outra doença ocular | 11 | 12,64 | 5 | 13,16 | 5 | 17,24 |
| Usuário de lente de contato | 4 | 4,60 | 2 | 5,26 | 1 | 3,45 |

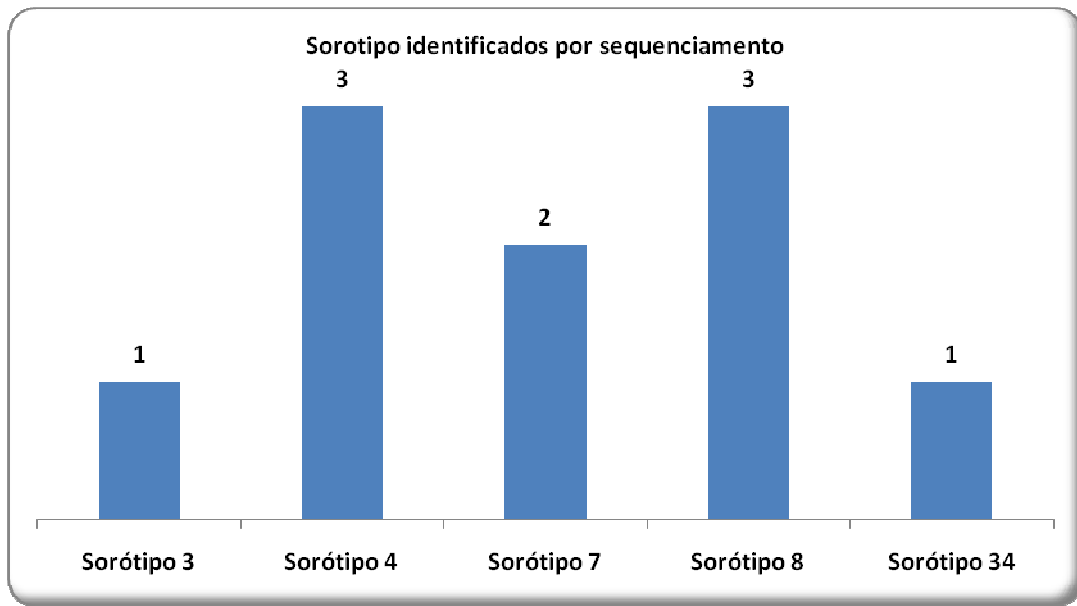


Figura 21 - Sorotipos identificados por secuenciamento.

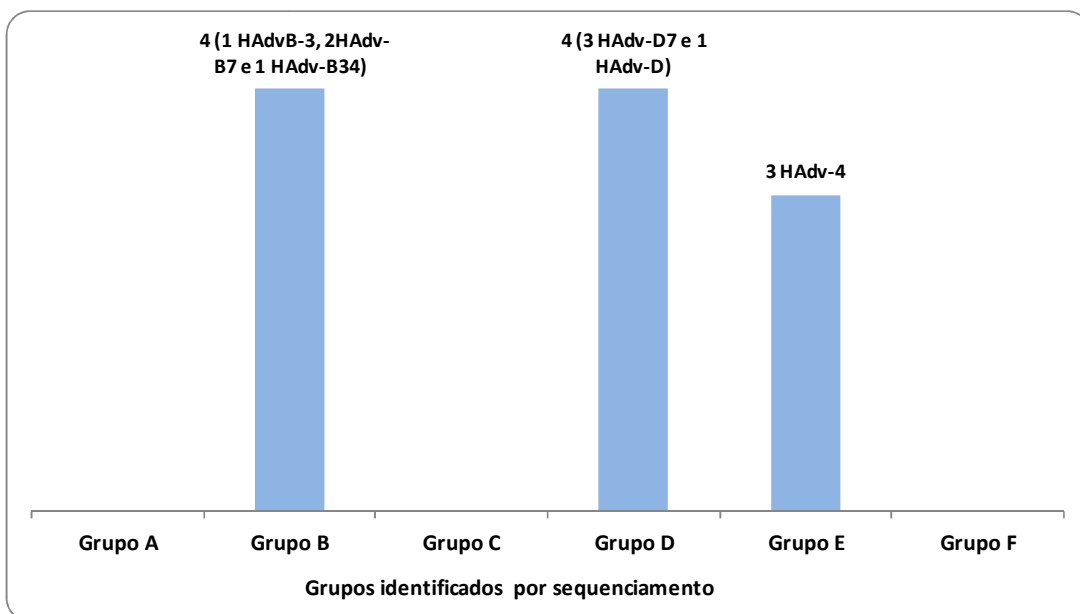


Figura 22 - Grupos identificados por secuenciamento.

4. DISCUSSÃO

Durante o período de maio de 2009 a fevereiro de 2011, 91 pacientes apresentaram-se com conjuntivite viral em uma clínica oftalmológica na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Desses, 42 foram diagnosticados com suspeita de conjuntivite por Adenovírus, com evolução de quadro muito característico (com conjuntivite aquosa, formação de pseudomembranas, infiltrados corneanos numulares), necessitando de ausentarem-se de suas atividades laborais e muitas vezes apesar dos esforços de restrição de contato acabaram por contagiar outras pessoas, em especial familiares. Achados esses em concordância com os sintomas descritos em outros artigos como o de Aoki et al. (2011).

A amplificação da banda de 301 pb de parte do gene da proteína II do capsômero viral por PCR, que foi utilizada como forma de identificação na amostra de secreção conjuntival da presença do Adenovírus, foi positiva em 33 amostras, 36,3% dos casos para conjuntivite viral e 54,76% para conjuntivite por Adenovírus. As figuras dos géis apresentam de modo bem evidente a banda de 301 pb. Outros estudos demonstram uma prevalência variável de 15 a 70% como os de Aoki e Tagawa (2002) e Mejia-Lopes et al. (2006). Na pesquisa de Matsui et al. (2008), realizada em Tokio, no período de 2005 e 2006, a prevalência chegou a 82%, sendo analisados 189 pacientes. Na Emergência do *Wills Eye Hospital, Samburky* encontraram-se o Adenovírus 8, mais frequentemente, com 34,8% dos casos e o sorotipo 11, o segundo mais frequente com 23,2%.

Inicialmente, neste trabalho, foram usados *primers*, conforme descrito no trabalho de Meija-Lopes et al. (2006), em que eram supostos como genérico; contudo, foram obtidos poucos resultados conclusivos. Diante disso, foram realizados estudos de avaliação no BLAST, onde os *primers* apresentaram-se mais específicos para o sorotipo 11, diferentemente do exposto como genérico. Foram refeitos os procedimentos, usando *primers* degenerados citados por Allard e colaboradores e utilizados por Maranhão et al. (2009). Os *primers* evidenciaram-se sensíveis a vários sorotipos de Adenovírus. No estudo de Maranhão et al. (2009) na cidade do Rio de Janeiro, o Adenovírus foi responsável por 60% dos casos de conjuntivite, sendo o tipo 19 o mais frequentemente encontrado, 46,7%; o grupo 8, em 15,5%, dos 66 pacientes avaliados no período de 2004 a 2007.

Já neste estudo, nos meses de maio e junho de 2009, houve um número maior de casos de conjuntivite, possivelmente em decorrência de surtos na região. Com forte suspeita de ser causada por Adenovírus, os pacientes clinicamente positivos vivenciaram, em sua maioria, grande desconforto por três a quatro semanas; a ceratite ocorreu em aproximadamente 36,8% dos pacientes e em 72,41% dos casos PCR+; a maioria teve infiltrados por cerca de quatro semanas.

Como forma de diagnóstico, o PCR com *primer* degenerado, após extração de DNA com kit de alta sensibilidade (*Qiamp UltraSens Virus*) da secreção conjuntival coletada e congelada em PBS imediatamente, revelou uma incidência de 36,3% de conjuntivite por Adenovírus. Os ensaios automatizados de extração e real time PCR permitem diagnóstico rápido (KOIDL et al., 2005). Os métodos de cultura viral são de alta sensibilidade e especificidade, contudo mais lentos, levando semanas; os otimizados levam cerca de três dias (KOWASKI et al., 1999). O método imunoenzimático de RPS (*Rapid Pathogen Screening*), entretanto, os supera em rapidez, sendo realizado em cerca de 10 minutos, no próprio consultório, com 88% de sensibilidade, quando comparada a cultura celular confirmada por imunofluorescência e com 91% de especificidade (SAMBURSKY et al., 2006).

No estudo de Maranhão e colaboradores (2009), o Coxsackievírus foi o segundo agente mais encontrado, o que sugere a realização de Multiplex PCR para diagnóstico, cobrindo Adenovírus e Coxsackievírus vírus (MARKOULATOS et al., 2002).

O sequenciamento permitiu definir o sorotipo com base nas variações individuais de parte do gene do Hexon (ALLARD et al., 2001). A análise de algumas

amostras revelou a presença dos tipos usuais e mais frequentes de conjuntivite por Adenovírus, sorotipos esses mais associados com ceratite como o sorotipo 4 e 8, assim como no estudo de Jim e colaboradores (2006) em Hanoi, Vietnã. A presença do sorotipo 7 em dois casos trouxe particular preocupação, em decorrência desses sorotipos terem sido associados a casos mais graves de infecção pelo Adenovírus, como o de pneumonia e o de miocardite, tendo como possível desfavorável evolução para insuficiência respiratória e insuficiência cardiovascular (ROBINSON et al., 2008).

Epidemias de ceratoconjuntivite também estão associadas a variações de nucleotídeos da proteína II do Hexon de Adenovírus 8 (KANAKO et al., 2009); o sorotipo 56 recentemente descoberto foi implicado a ceratoconjuntivite em neonato, associado à infeliz fatalidade, em decorrência de pneumonia. Três profissionais que cuidaram dessa criança tiveram ceratoconjuntivite, esse vírus apresentava sinais de recombinação entre Adenovírus D-15, D-29, D-9 e D-26. O receptor celular para os vírus do grupo D, os mais comumente implicados em ceratoconjuntivite, ainda permanece controverso; entretanto, a análise do punho da fibra sugere no estudo de Robinson e colaboradores (2008) que o grupo poderia se ligar a um receptor corneano como CD46 ou ácido siálico; uma possível baixa afinidade ao receptor CAR também seria possível.

Ainda não há tratamento disponível para conjuntivite por Adenovírus. Alguns estudos evidenciam resposta favorável do vírus ao Cidofovir (HILENKAMP et al., 2002), ao ácido siálico modificado (JOHANSSON et al., 2008) e com uso de imunoglobulinas tópicas. (NWANEGBO et al., 2007). Em razão dos efeitos adversos e da necessidade de mais estudos essas terapias ainda não estão disponíveis.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, analisaram-se, no período de maio de 2009 a janeiro de 2011, em uma clínica oftalmológica, em Viçosa, Minas Gerais, 91 casos de conjuntivite, supostamente de origem viral, concluindo-se que:

- Confirmaram-se, por PCR como de origem adenoviral, 33 pacientes (36,3%).
- Identificaram-se os sorotipos 3, 4, 7, 8 e 34, sendo a maior prevalência dos sorotipos 4 e 8 (60%).
- Apresentou-se eficiente o método de PCR para a identificação de conjuntivite adenoviral.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Saunders-Elsevier, 2008.

ABBONDANZO, S.L.; ENGLISH, C.K.; KAGAN, E.; McPHERSON, R.A. Fatal adenovirus pneumonia in newborn identified by electron microscopy and in situ hybridization. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 113, p. 1349-1353, 1989.

ALLANSIMITH, M.R.; GREINER, J.V.; BAIRD, R.S. Number of inflammatory cells in the normal conjunctiva. **American Journal of Ophthalmology**, v. 186, p. 25, 1978.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WANDELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 498-505, 2001.

AOKI, K.; KANEKO, H.; KITAICHI, N.; OHGUCHI, T.; TAGAWA, Y.; OHNO, S. Clinical features of adenoviral conjunctivitis at the early stage of infection. **Journal of Ophthalmology**, v. 55, p. 11-15, 2011.

AOKI, K.; TAGAWA, Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. **Int. Ophthalmology Clin.**, v. 42, p. 49-54, 2002.

ARNOLD, J.; JANOSKA, M.; KAJON, A.E.; METZGAR, D.; HUDSON, N.R.; TORRES, S.; HARRACH, B.; SETO, D.; CHODOSH, J.; JONES, M.S. Genomic characterization of human adenovirus 36, a putative obesity agent. **Virus Res.**, v. 149, p. 152-161, 2010.

BELL, J.A.; ROWE, W.B.; ENGLER, J.I. et al. Pharyngoconjunctival fever: epidemiological studies of a recently recognized disease entity. **JAMA**, v. 175, p. 1083-1092, 1955.

BROWN, T.A. **Gene cloning and DNA analysis**: an introduction. 6.ed. Wiley-Blackwell, 2010.

BRUDER, J.T.; KOVESDI, I. Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. **J. Virol.**, v. 71, p. 398-404, 1997.

CASTO, B.C. Adenovirus transformation of hamster embryo cell. **Journal of Virology**, p. 376-388, 1968.

CHENG, C.; HUANG, L.; KAO, C.; LU, P.; CHENG, J.; LU, C.; LEE, C.; CHANG, S.; CHANG, L. Molecular and clinical characteristics of adenoviral infection in Taiwanese children in 2004-2005. **Eu. J. Pediatr.**, v. 167, p. 633-640, 2008.

CHINTAKUNTLAWAR, A.V.; CHODOSH, J. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 29, p. 657-666, 2009.

CHODOSH, J.; KENNEDY, R. The conjunctival lymphoid follicle in mucosal immunology. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 5/6, p. 421-433, 2002.

ECKERT, K.A.; KUNKEL, T.A. **DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.

ENDERS, J.F.; BELL, J.A.; DINGLE, J.H. et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. **Science**, v. 124, p. 119-120, 1956.

WOLD, W.S.M.; HORWITZ, M.S. Fields' virology. **Adenoviruses**, v. 64, p. 2395-2436, 2007.

FLANAGAN, J.L.; WILLCOX, M.D.P. Role of lactoferrin in tear film. **Biochimie**, v. 91, p. 35-43, 2009.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A. **Principles of virology**. 3.ed. ASM Press, 2009.

FRIEDLAND, B.R.; ANDERSON, D.R.; FORSTER, R.K. No-lysozyme anti-bacterial factor in human tears. **American Journal of Ophthalmology**, v. 74, p. 52-59, 1972.

GIBBS, M.D.; REEVES, R.A.; MANDELMAN, D.; MI, Q.; LEE, J.; BERGQUIST, P.L. Molecular diversity and catalytic activity on thermus DNA polymerases. **Extremophiles**, v. 13, p. 817-826, 2009.

GOMES, J.A.; JINDAL, V.K.; GORMLEY, P.D.; DUA, H.S. Phenotypic analysis of resident lymphoid cell in the conjunctiva and adnexal tissues of rat. **Exp. Eye Res.**, v. 64, p. 991-997, 1997.

GORDON, Y.J.; ROMANOWSKI, E.; ARAULLO-CRUZ, T. No ocular model of adenovirus type 5 infection in the NZ rabbit. **Invest Ophthalmol Vis. Sci.**, v. 33, p. 574-580, 1992.

GORDON, Y.J.; ROMANOWSKI, E.; ARAULLO-CRUZ, T.; DE CLERCQ, E. Pretreatment with topical 0,1% (S)-1-(3hydroxy-2phosphonyl-methoxypropyl) cytosine inhibites adenovirus type replication in the New Zealand rabbit ocular model. **Cornea**, v. 11, p. 529-533, 1992.

HAMMER, L.H.; PERRY, H.D.; DONNENFELD, E.D. et al. Symblepharon formation in epidemic keratoconjunctivitis. **Cornea**, v. 9, p. 338-340, 1990.

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

HINGORANI, M.; METZ, D.; LIGHTMAN, S.L. Characterization of the normal conjunctival leukocytes population. **Exp. Eye Res.**, v. 64, p. 905-912, 1997.

JIM, X.; ISHIKO, H.; HA, N.T.; OHGUCHI, T.; AKANUMA, M.; AOKI, K.; OLMO, S. Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnan. **American Journal of Ophthalmology**, v. 142, p. 1064-1066, 2006.

JOHANSSON, S.; NILSSON, E.; QIAN, W.; GUILLIGAY, P.; CRESPIAN, T.; CUSACK, S.; AMBERG, N.; ELOFSSON, M. Design, synthesis and evaluation of N-acyl modified sialic acids as inhibitors of adenoviruses causing keratoconjunctivitis. **Journal Medical Chemistry**, v. 52, 3666-3678, 2009.

KANEKO, H.; ISHIKO, H.; OHGUCHI, T.; TAGAWA, Y.; AOKI, K.; SUZUTANI, T.; OHONO, S. Nucleotide sequence variation in hexon gene of human adenovirus type 8 and 37 strains from epidemic keratoconjunctivitis patients in Japan. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2260-2265, 2009.

KANSKI, J.J. **Clinical ophthalmology**: a systematic approach. 7.ed. Elsevier Saunders, 2011. p. 132-166.

KNOP, E.; KNOP, N.; CLAUS, P. Local production of secretory IgA in the eye-associated lymphoid tissue (EALT) of normal human ocular surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 6, p. 2322-2329, 2008.

KOIDL, C.; BOZIC, M.; MOSSBOCK, G.; MUHBAUER, G.; BERG, J.; STOCHER, M.; DEHNHART, J.; MARTH, E.; KESSLER, H.H. Rapid diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by fully automated molecular assay. **Ophthalmology**, v. 112, p. 1521-1527, 2005.

KOO, D. et al. Epidemic keratoconjunctivitis in University Medical Center ophthalmology clinic; need for re-evaluation of the design and disinfection of instruments. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 10, p. 547-552, 1989.

- KRISHER, K.K.; MENEGUS, M.A. Evaluation of three types of cell culture for recovery of adenovirus from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 1323-1324, 1987.
- LAIBSON, P.R.; GREEN, W.R. Conjunctival membranes in epidemic keratoconjunctivitis. **Arch. Ophthalmol.**, v. 83, p. 100-102, 1970.
- MARANHÃO, A.G.; SOARES, C.C.; ALBUQUERQUE, M.C.; SANTOS, N. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. **Revista Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 227-229, 2009.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, p. 47-51, 2002.
- MATSUI, K.; SHIMIZY, H.; YOSHIDA, A.; NAGAOKA, E.; NISHIO, O.; OKUDA, K. Monitoring of adenovirus from conjunctival scrapings in Japan during 2005-2006. **J. Med. Virol.**, v. 80, p. 997-1003, 2008.
- McCLELLAN, K.A.; FRACO, F. Mucosal defense of outer eye. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, n. 3, p. 233-246, 1997.
- MÉJIA-LOPEZ, H.; MATIAS-FLORENTINO, M.; VÉLEZ-MONTOYA, R. Identification of adenovirus associated with conjunctivitis by molecular methodology. **Arch. Soc. Esp. Oftalmol.**, v. 81, p. 375-382, 2006.
- MULLIS, K.; FALLONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 263-273, 1986.
- MULLIS, K.B. **The unusual origin of polymerase chain reaction.** Scientific American, 1990.
- NORRBY, E. The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. **J. Gen. Virol.**, v. 5, p. 221-236, 1969.
- NWANEGBO, E.C.; ROMANOWSKI, E.G.; GORDON, Y.G.; GAMBOTTO, A. Efficacy of topical immunoglobulins against experimental adenoviral ocular infection. **invest. Ophthalmol.**, v. 48, p. 4117-4176, 2007.
- PALOV, A.R.; PAVLOVA, N.V.; KOZYAVKIN, S.A.; SLESAREV, A.I. Recent developments in optimization of thermostable DNA Polymerases for Efficient Application. **Trends in Biology**, v. 22, p. 253-259, 2004.
- REDFERN, R.L.; McDERMOTT, A.M. Toll like receptor in ocular surface disease. **Experimental Eye Research**, v. 90, p. 679-687, 2010.

ROBINSON, C.M.; SHARIATI, F.; GILLASPY, A.F.; DYER, D.W.; CHODOSH, J. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37: new insights into cornea tropism. **BMC Genomics**, v. 9, p. 213, 2008.

ROWE, W.P.; HUEBNER, R.J.; GILMORE, L.K.; PARROT, R.H.; WARD, T.G. 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.

RYCHILIK, W.; SPENCER, W.J.; RHOADS, R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6409-6412, 1990.

RYU, J.H.; HIM, C.H.; YOON, J.H. Innate immune responses of the airway **Epithelium. Mol Cells**, v. 30, p. 173-183, 2010.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Reports**, p. 487-491, 1988.

SAMBURSKY, R.; TAUBE, S.; SCHINA, F.; KOZICH, K.; DAVIDSON, R.; COHEN, E. The RPS adeno detector for diagnosing adenoviral conjunctivitis. **Ophthalmology**, v. 113, p. 1758-1764, 2006.

SMOLIN, G. The defense mechanism of the outer eye. **Trans. Ophthalmol. Soc.**, v. 104, p. 363-366, 1985.

STEWART, P.; BURNETT, R.M. Adenovirus structure as revealed by x-ray crystallography, electron microscopy, a difference imaging. **J. Appl. Phys.**, v. 32, p. 1342-1347, 1993.

TOOGOOD, C.I.; CROMPTON, J.; HAY, R.T. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. **Journal Gen. Virology**, v. 73, p. 1429-1435, 1992.

TRENTIM, J.J.; YABE, Y.; TAYLOR, G. The quest for human cancer viruses. A new approach for an old problem reveals a cancer induction in hamsters by human adenovirus. **Science**, v. 137, p. 835-841, 1962.

VAN GINKEL, F.W.; GULLEY, S.L.; LAMMERS, A.; HOERR, F.J.; GURJAR, R.; TORO, H. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in avian mucosal immunity. **Developmental and Comparative Immunology**.

VANGUILDER, H.D.; VRAN, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression. **Analysis Biotechniques**, v. 44, p. 619-624, 2008.

VINEY, K.A.; KEHOE, P.J.; DOYLE, B.; SHEPPEARD, V.; ROBERTS-WITTEVEEN, A.R.; SEMIRLI, H.; McPHIE, K.A.; DWYER, D.E.; McANULTY, A. outbreak of epidemic Keratoconjunctivitis in regional ophthalmology clinic in New South Wales. **Epidemiol. Infect.**, v. 136, p. 1197-1206, 2008.

WEBER, C.M.; EICHENBAUM, J.W. Acute red eye: differentiating viral conjunctivitis from other, less common causes. **Postgrad Med. J.**, v. 101, p. 185-196, 1997.

WEISS, A. Acute conjunctivitis in childhood. **Curr. Probl. Pediatr.**, v. 24, p. 4-11, 1994.

WHITNEY, S.E.; SUDHIR, A.; NELSON, R.M.; VILJOEN, H.J. Principles of rapid polymerase chain reactions: mathematical modeling and experimental verification. **Computational Biology and Chemistry**, v. 28, p. 195-209, 2004.

YOLKEN, R. H.; LAWRENCE, F.; LEISTER, F. et al. Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. **J. Pediatr.**, v. 101, p. 21-26, 1982.

APÊNDICE

TABELAS GERADAS SPSS ESTATÍSTICA

Adenoviral clinicamente

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|-------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Sim | 38 | 43,7 | 43,7 | 43,7 |
| | Não | 49 | 56,3 | 56,3 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

PCR

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|--------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Positivo (+) | 29 | 33,3 | 33,3 | 33,3 |
| | Negativo (-) | 58 | 66,7 | 66,7 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Descriptive statistics

| | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|-------------------|----|---------|---------|------|----------------|
| Tempo de evolução | 85 | 1 | 4 | 2,24 | 1,040 |
| Valid N (semanas) | | | | | |

Adenoviral clinicamente * tempo de evolução crosstabulation

| | | Tempo de evolução (semanas) | | | | | Total |
|-------------------------|-----|-----------------------------|------|------|------|------|-------|
| | | 1,00 | 1,50 | 2,00 | 3,00 | 4,00 | 1,00 |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 1 | 0 | 5 | 19 | 11 | 36 |
| | Não | 23 | 7 | 12 | 7 | 0 | 49 |
| Total | | 24 | 7 | 17 | 26 | 11 | 85 |

Tempo de evolução * PCR crosstabulation

| | | PCR | | Total |
|-------------------|------|--------------|--------------|----------------|
| | | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+ -) |
| Tempo de evolução | 1,00 | 4 | 20 | 24 |
| | 1,50 | 1 | 6 | 7 |
| | 2,00 | 6 | 11 | 17 |
| | 3,00 | 10 | 16 | 26 |
| | 4,00 | 7 | 4 | 11 |
| Total | | 28 | 57 | 85 |

Adenoviral clinicamente * PCR crosstabulation

| | | PCR | | Total |
|-------------------------|-----|--------------|--------------|----------------|
| | | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+ -) |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 19 | 19 | 38 |
| | Não | 10 | 39 | 49 |
| Total | | 29 | 58 | 87 |

Adenoviral clinicamente * PCR * tempo de evolução crosstabulation

| Tempo de evolução | | | PCR | | Total |
|-------------------|-------------------------|-----|--------------|--------------|----------------|
| | | | Positivo (+) | Negativo (-) | Positivo (+ -) |
| 1,00 | Adenoviral clinicamente | Sim | 0 | 1 | 1 |
| | | Não | 4 | 19 | 23 |
| | Total | | 4 | 20 | 24 |
| 1,50 | Adenoviral clinicamente | Não | 1 | 6 | 7 |
| | Total | | 1 | 6 | 7 |
| 2,00 | Adenoviral clinicamente | Sim | 4 | 1 | 5 |
| | | Não | 2 | 10 | 12 |
| | Total | | 6 | 11 | 17 |
| 3,00 | Adenoviral clinicamente | Sim | 7 | 12 | 19 |
| | | Não | 3 | 4 | 7 |
| | Total | | 10 | 16 | 26 |
| 4,00 | Adenoviral clinicamente | Sim | 7 | 4 | 11 |
| | Total | | 7 | 4 | 11 |

Descriptive statistics

| | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|--------------------|----|---------|---------|-------|----------------|
| Idade | 87 | 1 | 74 | 30,61 | 17,581 |
| Valid N (listwise) | 87 | | | | |

Faixa de idade

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|-------------------------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Lactantes (até 2 anos) | 4 | 4,6 | 4,6 | 4,6 |
| | Crianças (2 a 11 anos) | 7 | 8,0 | 8,0 | 12,6 |
| | Adolescentes (12 a 17 anos) | 11 | 12,6 | 12,6 | 25,3 |
| | Adultos jovens (18 a 25 anos) | 9 | 10,3 | 10,3 | 35,6 |
| | Adultos (26 a 65 anos) | 53 | 60,9 | 60,9 | 96,6 |
| | Idosos (mais de 65 anos) | 3 | 3,4 | 3,4 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Sexo

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|-----------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Masculino | 39 | 44,8 | 44,8 | 44,8 |
| | Feminino | 48 | 55,2 | 55,2 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Frequency table

Ceratite

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 32 | 36,8 | 36,8 | 37,9 |
| | Não | 54 | 62,1 | 62,1 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Membrana conjuntival

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 2 | 2,3 | 2,3 | 2,3 |
| | Sim | 10 | 11,5 | 11,5 | 13,8 |
| | Não | 75 | 86,2 | 86,2 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Secreção aquosa

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 83 | 95,4 | 95,4 | 96,6 |
| | Não | 3 | 3,4 | 3,4 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Secreção purulenta

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 4 | 4,6 | 4,6 | 5,7 |
| | Não | 82 | 94,3 | 94,3 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Desconforto a dor

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Leve | 50 | 57,5 | 57,5 | 58,6 |
| | Moderada | 29 | 33,3 | 33,3 | 92,0 |
| | Forte | 7 | 8,0 | 8,0 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Ferida na córnea

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| | Sim | 5 | 5,7 | 5,8 | 7,0 |
| | Não | 80 | 92,0 | 93,0 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Febre

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 13 | 14,9 | 14,9 | 16,1 |
| | Não | 73 | 83,9 | 83,9 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Mal-estar

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Dados faltosos | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 38 | 43,7 | 43,7 | 44,8 |
| | Não | 48 | 55,2 | 55,2 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Linfadenopatia satélite

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Não teve | 3 | 3,3 | 3,3 | 3,3 |
| | Sim | 34 | 39,1 | 39,5 | 41,9 |
| | Não | 50 | 57,5 | 58,1 | 100,0 |
| | Total | 86 | 98,9 | 100,0 | |
| Total | | 87 | 100,0 | | |

Quemose conjuntival

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Não teve | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| | Sim | 48 | 55,2 | 55,2 | 56,3 |
| | Não | 38 | 43,7 | 43,7 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Hemorragia subconjuntival

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|----------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Não teve | 2 | 2,3 | 2,3 | 2,3 |
| | Sim | 10 | 11,5 | 11,5 | 13,8 |
| | Não | 75 | 86,2 | 86,2 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Presença de outra doença ocular

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|-------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Sim | 11 | 12,6 | 12,6 | 12,6 |
| | Não | 76 | 87,4 | 87,4 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Usuário de lente de contato

| | | Frequency | Percent | Valid percent | Cumulative percent |
|-------|-------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| Valid | Sim | 4 | 4,6 | 4,6 | 4,6 |
| | Não | 83 | 95,4 | 95,4 | 100,0 |
| | Total | 87 | 100,0 | 100,0 | |

Descriptive statistics

| | N | Minimum | Maximum | Mean | Std. Deviation |
|--|----|---------|---------|-------|----------------|
| Tempo de permanência dos infiltrados (semanas) | 29 | 1 | 44 | 7,00 | 8,771 |
| Dia de início da ceratite | 27 | 5 | 14 | 9,00 | 3,026 |
| Amostra colhida no dia de evolução | 87 | 1 | 317 | 11,90 | 37,819 |
| Valid N (listwise) | 27 | | | | |

Statistics

| | | Tempo de permanência dos infiltrados | Dia de início da ceratite | Amostra colhida no dia de evolução |
|-------------|---------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| N | Valid | 29 | 27 | 87 |
| | Missing | 58 | 60 | 0 |
| Mean | | 7,00 | 9,00 | 11,90 |
| Median | | 4,00 | 10,00 | 5,00 |
| Mode | | 4 | 7(a) | 5 |
| Minimum | | 1 | 5 | 1 |
| Maximum | | 44 | 14 | 317 |
| Percentiles | 25 | 3,00 | 7,00 | 3,00 |
| | 50 | 4,00 | 10,00 | 5,00 |
| | 75 | 7,00 | 11,00 | 7,00 |

a Multiple modes exist. The smallest value is shown

Adenoviral clinicamente * Ceratite crosstabulation

| | | Ceratite | | | |
|-------------------------|-----|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 1 | 20 | 17 | 38 |
| | Não | 0 | 12 | 37 | 49 |
| Total | | 1 | 32 | 54 | 87 |

Adenoviral clincamente * Membrana conjuntival crosstabulation

| | | Membrana conjuntival | | | |
|------------------------|-----|----------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clincamente | Sim | 2 | 7 | 29 | 38 |
| | Não | 0 | 3 | 46 | 49 |
| Total | | 2 | 10 | 75 | 87 |

Adenoviral clincamente * Secreção aquosa crosstabulation

| | | Secreção aquosa | | | |
|------------------------|-----|-----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clincamente | Sim | 1 | 36 | 1 | 38 |
| | Não | 0 | 47 | 2 | 49 |
| Total | | 1 | 83 | 3 | 87 |

Adenoviral clincamente * Secreção purulenta crosstabulation

| | | Secreção purulenta | | | |
|------------------------|-----|--------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clincamente | Sim | 1 | 2 | 35 | 38 |
| | Não | 0 | 2 | 47 | 49 |
| Total | | 1 | 4 | 82 | 87 |

Adenoviral clincamente * Desconforto a dor crosstabulation

| | | Desconforto a dor | | | | |
|------------------------|-----|-------------------|------|----------|-------|-------|
| | | Dados faltosos | Leve | Moderada | Forte | Total |
| Adenoviral clincamente | Sim | 1 | 18 | 15 | 4 | 38 |
| | Não | 0 | 32 | 14 | 3 | 49 |
| Total | | 1 | 50 | 29 | 7 | 87 |

Adenoviral clincamente * Ferida na córnea crosstabulation

| | | Ferida na córnea | | | |
|------------------------|-----|------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clincamente | Sim | 2 | 3 | 33 | 38 |
| | Não | 0 | 2 | 47 | 49 |
| Total | | 2 | 5 | 80 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Febre crosstabulation

| | | Febre | | | |
|-------------------------|-----|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 1 | 6 | 31 | 38 |
| | Não | 0 | 7 | 42 | 49 |
| Total | | 1 | 13 | 73 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Mal-estar crosstabulation

| | | Mal-estar | | | |
|-------------------------|-----|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 1 | 15 | 22 | 38 |
| | Não | 0 | 23 | 26 | 49 |
| Total | | 1 | 38 | 48 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Linfadenos crosstabulation

| | | Linfadenos | | | |
|-------------------------|-----|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 2 | 21 | 15 | 38 |
| | Não | 0 | 13 | 36 | 49 |
| Total | | 2 | 34 | 51 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Quemoseconjuntival crosstabulation

| | | Secreção purulenta | | | |
|-------------------------|-----|--------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 1 | 29 | 8 | 38 |
| | Não | 0 | 19 | 30 | 49 |
| Total | | 1 | 48 | 38 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Hemorragia subconjuntival crosstabulation

| | | Hemorragia subconjuntival | | | |
|-------------------------|-----|---------------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 2 | 6 | 30 | 38 |
| | Não | 0 | 4 | 45 | 49 |
| Total | | 2 | 10 | 75 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Presença de outra doença ocular crosstabulation

| | | Presença de outra doença ocular | | |
|-------------------------|-----|---------------------------------|-----|-------|
| | | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 5 | 33 | 38 |
| | Não | 6 | 43 | 49 |
| Total | | 11 | 76 | 87 |

Adenoviral clinicamente * Usuário de LC crosstabulation

| | | Usuário de LC | | |
|-------------------------|-----|---------------|-----|-------|
| | | Sim | Não | Total |
| Adenoviral clinicamente | Sim | 2 | 36 | 38 |
| | Não | 2 | 47 | 49 |
| Total | | 4 | 83 | 87 |

PCR * Ceratite crosstabulation

| | | Ceratite | | | |
|-------|--------------|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 21 | 7 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 11 | 47 | 58 |
| Total | | 1 | 32 | 54 | 87 |

PCR * Membrana conjuntival crosstabulation

| | | Membrana conjuntival | | | |
|-------|--------------|----------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 2 | 6 | 21 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 4 | 54 | 58 |
| Total | | 2 | 10 | 75 | 87 |

PCR * Secreção aquosa crosstabulation

| | | Secreção aquosa | | | |
|-------|--------------|-----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 27 | 1 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 56 | 2 | 58 |
| Total | | 1 | 83 | 3 | 87 |

PCR * Secreção purulenta crosstabulation

| | | Secreção purulenta | | | |
|-------|--------------|--------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 1 | 27 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 3 | 55 | 58 |
| Total | | 1 | 4 | 82 | 87 |

PCR * Desconforto a dor crosstabulation

| | | Desconforto a dor | | | | |
|-------|--------------|-------------------|------|----------|-------|-------|
| | | Faltoso | Leve | Moderada | Forte | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 13 | 9 | 6 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 37 | 20 | 1 | 58 |
| Total | | 1 | 50 | 29 | 7 | 87 |

PCR * Ferida na córnea crosstabulation

| | | Ferida na córnea | | | |
|-------|--------------|------------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 2 | 3 | 24 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 2 | 56 | 58 |
| Total | | 2 | 5 | 80 | 87 |

PCR * Febre crosstabulation

| | | Febre | | | |
|-------|--------------|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 5 | 23 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 8 | 50 | 58 |
| Total | | 1 | 13 | 73 | 87 |

PCR * Mal-estar crosstabulation

| | | Mal-estar | | | |
|-------|--------------|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 14 | 14 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 24 | 34 | 58 |
| Total | | 1 | 38 | 48 | 87 |

PCR * Linfadenos cross-tabulation

| | | Linfadenos | | | |
|-------|--------------|----------------|-----|-----|-------|
| | | Dados faltosos | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 2 | 18 | 9 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 16 | 42 | 58 |
| Total | | 2 | 34 | 51 | 87 |

PCR * Quemose conjuntival cross-tabulation

| | | Quemose conjuntival | | | |
|-------|--------------|---------------------|-----|-----|-------|
| | | Não teve | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 23 | 5 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 25 | 33 | 58 |
| Total | | 1 | 48 | 38 | 87 |

PCR * Hemorragia subconjuntival cross-tabulation

| | | Hemorragia subconjuntival | | | |
|-------|--------------|---------------------------|-----|-----|-------|
| | | Não teve | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 2 | 6 | 21 | 29 |
| | Negativo (-) | 0 | 4 | 54 | 58 |
| Total | | 2 | 10 | 75 | 87 |

PCR * Presença de outra doença ocular cross-tabulation

| | | Presença de outra doença ocular | | |
|-------|--------------|---------------------------------|-----|-------|
| | | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 5 | 24 | 29 |
| | Negativo (-) | 6 | 52 | 58 |
| Total | | 11 | 76 | 87 |

PCR * Usuário de LC cross-tabulation

| | | Usuário de LC | | |
|-------|--------------|---------------|-----|-------|
| | | Sim | Não | Total |
| PCR | Positivo (+) | 1 | 28 | 29 |
| | Negativo (-) | 3 | 55 | 58 |
| Total | | 4 | 83 | 87 |

PCR * Sexo crosstabulation

| | | Sexo | | |
|-------|--------------|-----------|----------|-------|
| | | Masculino | Feminino | Total |
| PCR | Positivo (+) | 13 | 16 | 29 |
| | Negativo (-) | 26 | 32 | 58 |
| Total | | 39 | 48 | 87 |

PCR * Faixas de idade crosstabulation

| | | Faixas de idade | | | | | | Total |
|-------|--------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| | | Lactantes (até 2 anos) | Crianças (2 a 11 anos) | Adolescentes (12 a 17 anos) | Adultos jovens (18 a 25 anos) | Adultos (26 a 65 anos) | Idosos (mais de 65 anos) | |
| PCR | Positivo (+) | 3 | 1 | 5 | 2 | 18 | 0 | 29 |
| | Negativo (-) | 1 | 6 | 6 | 7 | 35 | 3 | 58 |
| Total | | 4 | 7 | 11 | 9 | 53 | 3 | 87 |

Chi-square tests

| | Value | df | Asymp. Sig. (2-sided) |
|------------------------------|----------|----|-----------------------|
| Pearson Chi-Square | 7,005(a) | 5 | ,220 |
| Likelihood Ratio | 7,897 | 5 | ,162 |
| Linear-by-Linear Association | ,941 | 1 | ,332 |
| N of Valid Cases | 87 | | |

a. 8 cells (66,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,00.

Associação entre faixas de idade * Adenoviral clinicamente crosstabulation

| | | Adenoviral clinicamente | | |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------|--------|
| | | Sim | Não | Total |
| Lactantes (até 2 anos) | Count | 3 | 1 | 4 |
| | Expected count | 1,7 | 2,3 | 4,0 |
| | % within EscoreIdade | 75,0% | 25,0% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 7,9% | 2,0% | 4,6% |
| | Adjusted Residual | 1,3 | -1,3 | |
| Crianças (2 a 11 anos) | Count | 4 | 3 | 7 |
| | Expected Count | 3,1 | 3,9 | 7,0 |
| | % within EscoreIdade | 57,1% | 42,9% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 10,5% | 6,1% | 8,0% |
| | Adjusted Residual | ,7 | -,7 | |
| Adolescentes (12 a 17 anos) | Count | 6 | 5 | 11 |
| | Expected Count | 4,8 | 6,2 | 11,0 |
| | % within EscoreIdade | 54,5% | 45,5% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 15,8% | 10,2% | 12,6% |
| | Adjusted Residual | ,8 | -,8 | |
| Adultos jovens (18 a 25 anos) | Count | 4 | 5 | 9 |
| | Expected Count | 3,9 | 5,1 | 9,0 |
| | % within EscoreIdade | 44,4% | 55,6% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 10,5% | 10,2% | 10,3% |
| | Adjusted Residual | ,0 | ,0 | |
| Adultos (26 a 65 anos) | Count | 19 | 34 | 53 |
| | Expected Count | 23,1 | 29,9 | 53,0 |
| | % within EscoreIdade | 35,8% | 64,2% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 50,0% | 69,4% | 60,9% |
| | Adjusted Residual | -1,8 | 1,8 | |
| Idosos (mais de 65 anos) | Count | 2 | 1 | 3 |
| | Expected Count | 1,3 | 1,7 | 3,0 |
| | % within EscoreIdade | 66,7% | 33,3% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 5,3% | 2,0% | 3,4% |
| | Adjusted Residual | ,8 | -,8 | |
| Total | Count | 38 | 49 | 87 |
| | Expected Count | 38,0 | 49,0 | 87,0 |
| | % within EscoreIdade | 43,7% | 56,3% | 100,0% |
| | % within Adenoviral clinicamente | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Chi-square tests

| | Value | df | Asymp. Sig. (2-sided) |
|------------------------------|----------|----|-----------------------|
| Pearson chi-square | 4,606(a) | 5 | ,466 |
| Likelihood ratio | 4,641 | 5 | ,461 |
| Linear-by-linear association | 2,760 | 1 | ,097 |
| N of valid cases | 87 | | |

a 8 cells (66,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,31.

Associação entre Sexo * Adenoviral clinicamente Crosstabulation

| | | | Adenoviral clinicamente | | |
|-------|-----------|----------------------------------|-------------------------|--------|--------|
| | | | Sim | Não | Total |
| Sexo | Masculino | Count | 14 | 25 | 39 |
| | | Expected Count | 17,0 | 22,0 | 39,0 |
| | | % within Sexo | 35,9% | 64,1% | 100,0% |
| | | % within Adenoviral clinicamente | 36,8% | 51,0% | 44,8% |
| | | Adjusted Residual | -1,3 | 1,3 | |
| | Feminino | Count | 24 | 24 | 48 |
| | | Expected Count | 21,0 | 27,0 | 48,0 |
| | | % within Sexo | 50,0% | 50,0% | 100,0% |
| | | % within Adenoviral clinicamente | 63,2% | 49,0% | 55,2% |
| | | Adjusted Residual | 1,3 | -1,3 | |
| Total | | Count | 38 | 49 | 87 |
| | | Expected Count | 38,0 | 49,0 | 87,0 |
| | | % within Sexo | 43,7% | 56,3% | 100,0% |
| | | % within Adenoviral clinicamente | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Chi-square tests

| | Value | df | Asymp. Sig. (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) |
|------------------------------|----------|----|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Pearson Chi-Square | 1,740(b) | 1 | ,187 | | |
| Continuity Correction(a) | 1,214 | 1 | ,271 | | |
| Likelihood Ratio | 1,751 | 1 | ,186 | | |
| Fisher's Exact Test | | | | ,201 | ,135 |
| Linear-by-Linear Association | 1,720 | 1 | ,190 | | |
| N of Valid Cases | 87 | | | | |

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 17,03.

Associação entre sexo * PCR crosstabulation

| | | | PCR | | |
|-------|-----------|-------------------|--------------|--------------|--------|
| | | | Positivo (+) | Negativo (-) | Total |
| Sexo | Masculino | Count | 13 | 26 | 39 |
| | | Expected Count | 13,0 | 26,0 | 39,0 |
| | | % within Sexo | 33,3% | 66,7% | 100,0% |
| | | % within PCR | 44,8% | 44,8% | 44,8% |
| | | Adjusted Residual | ,0 | ,0 | |
| | Feminino | Count | 16 | 32 | 48 |
| | | Expected Count | 16,0 | 32,0 | 48,0 |
| | | % within Sexo | 33,3% | 66,7% | 100,0% |
| | | % within PCR | 55,2% | 55,2% | 55,2% |
| | | Adjusted Residual | ,0 | ,0 | |
| Total | | Count | 29 | 58 | 87 |
| | | Expected Count | 29,0 | 58,0 | 87,0 |
| | | % within Sexo | 33,3% | 66,7% | 100,0% |
| | | % within PCR | 100,0% | 100,0% | 100,0% |