



Universidad Nacional Autónoma de

Facultad de Medicina
División de Estudios de Postgrado

Instituto de Oftalmología
“Fundación Conde de
Valenciana”

**Análisis Clínico y
Molecular**
**de las Infecciones por
Adenovirus en el Instituto
Fundación Conde de
Valenciana.**

TESIS DE POSGRADO
Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGIA

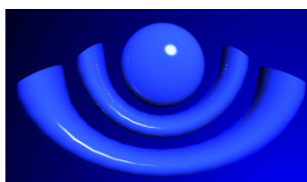
Presenta el

DR. RAÚL VÉLEZ MONTOYA

DIRECTORES DE TESIS

DRA. HERLINDA MEJIA LOPEZ

DRA. CONCEPCION SANTACRUZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis Padres.
Que aún después de tantos años
siguen apoyándome y creyendo en mí.

A mis Hermanos.
Por su paciencia y comprensión.

A mis amigos.
Por que siempre han creído en mí.

A mis compañeros Residentes.
Gracias por las risas, vivencias, y su amistad
en estos años maravillosos.
Mucho éxito colegas.

A los pacientes.
Por que solo a través de ellos
soy.

A mis maestros y colaboradores de
este estudio. Gracias por su ayuda y los
conocimientos adquiridos.

Al Instituto “Fundación Conde de la Valenciana”
Gracias por la oportunidad recibida.

Dr. Enrique L. Graue Wiechers.
Profesor Titular del Curso.

Herlinda Mejía López M. en C.
Director de Tesis.

Dra. Concepción Santacruz.
Director de Tesis.

Dra. Claudia Murillo Correa
Jefa de Enseñanza

Tabla de Contenidos:

Título	Página
Resumen	9
Introducción	9
Métodos y Pacientes	10
Muestras Clínicas	11
Extracción de DNA	11
PCR Genérico	11
Tipificación de Adenovirus por Nest-PCR-RFLP	11
PRC Multiplex específico para Subgénero C	12
Resultados	12
PCR Genérico	12
Tipificación de Adenovirus por Nest-PCR-RFLP	15
PCR Multiplex	16
Conclusión	16
Bibliografía	19

RESUMEN:

Objetivo: Correlacionar las manifestaciones clínicas de la conjuntivitis folicular con serotipos de adenovirus.

Métodos: Se estudiaron 53 pacientes en quienes se evaluaron parámetros compatibles con un diagnóstico probable de conjuntivitis folicular. Muestras de raspado del saco conjuntival inferior de cada paciente, fueron procesadas para identificar adenovirus por medio de la PCR genérica. Los serotipos fueron identificados por una Nest-PCR-RFLP y una PCR-Multiplex. El análisis estadístico se hizo con estadística descriptiva. La correlación entre los datos clínicos y los hallazgos de laboratorio se realizó mediante análisis de Chi cuadrada.

Resultados: La quemosis severa tubo una relación estadísticamente significativa con los datos de positividad por PCR genérico ($P < 0.01$). La Nest-PCR-RFLP permitió la identificación de Ad3 (subgénero B) en 11 de la muestra estudiada, mientras que la PCR multiplex reveló la presencia del serotipo Ad1 en dos muestras y 16 muestras presentaron del serotipo Ad2, ambos pertenecientes al subgénero C. El estudio estadístico de los datos clínicos, pudo relacionar la existencia de faringitis con los serotipos pertenecientes al subgénero C de adenovirus ($P < 0.05$).

Conclusiones: Este es el primer reporte de infección oftálmica por adenovirus en México; y muestra que la presencia de quemosis severa y de faringitis, son datos exploratorios que podrían identificar una infección verdadera por adenovirus. El resto de las manifestaciones clínicas investigadas no brindan orientación clínica para inferir la etiología. La utilización de la PCR y sus modificaciones, así como el análisis de restricción, fueron herramientas útiles para la identificación y caracterización de los subgéneros B y C de adenovirus.

Palabras Clave: infecciones oculares, Conjuntivitis, Adenovirus, epidemiología molecular, PCR.

Introducción:

De los principales motivos de consulta en la práctica médica, tanto general como oftalmológica, se encuentran las conjuntivitis ^(3,9). Estas se caracterizan por la inflamación de la capa de tejido que recubre la superficie ocular y la cara interna de los párpados llamada conjuntiva ⁽⁷⁾. Las conjuntivitis de etiología viral es la más frecuentes ⁽⁸⁾. Los Adenovirus son los agentes etiológicos responsables hasta en el 91.5% de los casos ^(8,9). Otros microorganismos tales como Herpes Simple, Varicela Zoster, Enterovirus y *Chlamydia trachomatis* producen manifestaciones clínicas parecidas ^(7,8). Los adenovirus pueden producir tres tipos de cuadros clínicos: Conjuntivitis Folicular, Queratoconjuntivitis epidémica y la fiebre faringoconjuntival. ^(3,11)

Las manifestaciones clínicas pueden causar desde leves y ocasionales hasta severas y crónicas, pudiendo permanecer varios meses ⁽²⁾; constituyéndose como una causa importante de absentismo escolar y laboral ⁽⁹⁾. Dentro de las manifestaciones leves se encuentran la sensación de cuerpo extraño, dolor, fotofobia, quemosis irritación ocular, comúnmente presentarse los pacientes como ojo rojo, lagrimeo, disminución de la agudeza visual,

manifestada comúnmente como visión borrosa. ^(3,7) En las manifestaciones clínicas más graves se encuentran la formación de pseudomembranas ^(3,7), ptosis ⁽³⁾, infiltrados subepiteliales ^(3,7), iridociclitis ⁽³⁾ y disminución importante de la agudeza visual.^(2,3)

Los adenovirus fueron aislados por primera vez por Rowe y col en 1953. ⁽¹⁰⁾ Actualmente existen 51 serotipos de adenovirus identificados, que se agrupan en 6 subgéneros (A a F) ^(1,6,11) de acuerdo a sus características fisicoquímicas, oncogenicidad, patrones de hemoaglutinación y homología en el DNA ^(1,2,6,11) Estos virus pueden sobrevivir durante varios días en superficies plásticas, metales y tejido de cicatrización ⁽⁴⁾. Los pertenecientes al subgénero C (Ad1, Ad2, Ad5 y Ad6) se aíslan hasta en el 59% de los casos de infecciones de vías respiratorias ⁽¹⁾. Los tipos identificados, como responsables de la mayoría de los casos de conjuntivitis foliculares son el Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad7, Ad8, Ad11, Ad13, Ad14, Ad15, Ad19, Ad21, Ad34 y Ad37 ^(5,10,11) Los agentes más frecuentes de casos esporádicos son el Ad3 y Ad4 ⁽¹⁰⁾, mientras que los casos epidémicos se atribuyen las especies pertenecientes al grupo D (Ad8, Ad19 y Ad37). ^(2,10)

Actualmente es imposible identificar el subgénero de adenovirus y mucho menos el serotipo, con base en las manifestaciones clínicas. El objetivo de este estudio fue hacer la revisión sistemática de todos los pacientes que acudieron al servicio de oftalmología integral de nuestra institución, con signos y síntomas compatibles con conjuntivitis folicular, correlacionándolos con los serotipos de adenovirus, identificados mediante pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR-anidado (Nest-PCR) y análisis de restricción (RFLP).

Métodos y Pacientes:

El protocolo fue revisado y aprobado por el comité científico y de bioética de la institución. La muestra comprendió 53 pacientes con sintomatología compatible con un diagnóstico probable de conjuntivitis folicular del 1^{ro} de abril 2005 al 1^{ro} febrero 2006. Se incluyeron a todos los pacientes mayores de 15 años y que hubieran firmado un consentimiento informado. Se hizo un registro de cada paciente y se obtuvieron los siguientes datos: nombre, edad, dirección, teléfono, diagnóstico inicial, ojo afectado (derecho, izquierdo o ambos ojos), intensidad subjetiva en escala de 0 a 10, calificada por el propio paciente del dolor, ardor, fotofobia y prurito. Y la existencia o ausencia de sensación de cuerpo extraño. A la exploración física se registró la presencia de membrana, pseudo-membrana o ausencia de la misma. La calificación del ojo rojo y de la quemosis se realizó por el explorador de manera objetiva. Dividiéndose para su reporte en Leve, moderada y severa, dependiendo de número de cuadrantes de la superficie ocular afectados.

Considerándose como leve cuando estuvieron 2 cuadrantes afectados, moderada cuando estuvieron afectados de 2 a 4 cuadrantes y severa si se afectan más de 4 cuadrantes. Los fondos de saco, tanto inferior como superior, también fueron considerados como cuadrantes. El lagrimeo se valoró en escala de leve moderado o severo de acuerdo al número de veces que necesite el paciente limpiarse las lágrimas al día. 2 veces al día es leve, 2-4 veces es moderada y más de 4 veces es severo. Las manifestaciones extraoculares exploradas fueron: La existencia de Descarga nasal anterior, adenomegalias (cervicales anteriores, submandibulares y periauriculares) y faringitis. Se tomó control fotográfico de los casos severos con cámara digital. Todos los cuestionarios y las exploraciones físicas fueron llevada a cabo por un solo médico entre el día cero al día dos del diagnóstico. El análisis estadístico se realizó con estadística descriptiva y la correlación entre los datos clínicos y los hallazgos de laboratorio mediante análisis de Chi cuadrada.

Muestras clínicas. La toma de la muestra a cada paciente estudiado, se realizó haciendo un raspado de saco conjuntival inferior utilizando un hisopo de arginato de calcio, el cual se introdujo posteriormente en un medio de transporte conteniendo 50mg/ml de gentamicina, 500U de penicilina-estreptomicina/ml, fungizona 1mg/ml y 5% albúmina sérica bobina en un buffer de Hank.

Extracción de DNA. La extracción de ADN se realizó con el mini kit QIAamp según protocolo de Quiagen (QIAGEN, Sciences. Meryland, USA). El material genético fue almacenado a -20°C hasta su identificación.

PCR genérico. Los oligonucleótidos ADRJC1 y ADRJC2 fueron usados para amplificar un producto de PCR de 140pb (Tabla 1). Este amplificado corresponde a una región altamente conservada del ADN que codifica para la proteína que constituye a los capsómeros de todos los adenovirus. Como controles se usaron Ad1, Ad2 y Ad5, aislados de pacientes con Infección Respiratoria Aguda, previamente caracterizados. Cada reacción fue hecha según el protocolo de Elnifro EM y cols (11), en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio

(1µg/ml). Se usó como marcador estándar de pesos moleculares el Ready-Load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.).

Tipificación de adenovirus por Nest-PCR-RFLP. Con el fin de identificar los serotipos responsables de la infección; a las muestras positivas en el PCR genérico, se procesaron para Nest-PCR según protocolo de Saito-Inagawa y cols. Los oligonucleótidos AdnU-S' y AdnU-A (Tabla 1), amplifican una secuencia del gen de la proteína exon que comparten los adenovirus Ad2-8, Ad11, Ad14, Ad19, Ad37, Ad40 y Ad41. Los amplificados se sometieron al análisis de restricción (RFLP), con las enzimas Eco130I (Styl), BsuRI (HaeIII) (Fermentas LC; ER0411 y ER0151 respectivamente) y Hinf I (Promega Corp; R6101). Los protocolos de digestión se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los productos de digestión fueron corridos en electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, 50 Volts/2 h y teñido con bromuro de etidio.⁽¹¹⁾ Como marcadores estándar de pesos moleculares se usó el Low Mass Ladder (Invitrogen, L.T.) y φX174DNA/Hae III (Promega, Corp.).

PCR multiplex específica para el subgénero C. Se usaron olinonucleótidos que reconocen el gen que codifica para el filamento de los adenovirus Ad1, Ad2 y Ad5 del subgenero C. El olinonucleótido AdCF, es común en los tres Ad y los oligonucleótidos Ad1R, Ad2R y Ad5R (Tabla 1) pertenecen al ADN que codifica el filamento de los serotipos correspondientes. El PCR multiplex permitió la obtención de los amplicones de 630pb, 204pb y 455pb, correspondientes a los serotipos Ad1, Ad5 y Ad2 respectivamente. Fueron usados como controles Ad1, Ad2 y Ad5, aislados de pacientes con Infección Respiratoria Aguda, previamente caracterizados. Cada reacción fue hecha según protocolo Adhikary AK y cols. (12) y se llevo a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut). Los productos de amplificación fueron separado en un gel de agarosa al 1.5 % y teñido con bromuro de etidio (1ug/ml). Como marcador estándar de pesos moleculares se usó el Low Mass Ladder (Invitrogen, L.T.)

Tabla 1. Oligonucleótidos genéricos y serotipo-específicos

Tipo de PCR	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
Genérico	ADRJC1	5'-GACATGACTTTTCGAGGTCGATCCCATGGA-3'	140
	ADRJC2	5'-CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA-3'	
Nest-PCR	AdnU-S'	5'-TTCCCCATGGCNCACAACAC-3'	956
	AdnU-A	5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3'	
PCR-multiplex	AdCF	5'-TGCTTGC GCTHAAAATGGGCA-3'	
	Ad1	Ad1R 5'-CGAGTATAAGACGCCTATTTACA-3'	630
	Ad2	Ad2R 5'-CGCTAAGAGCGCCGCTAGTA-3'	204
	Ad5	Ad5R 5'-ATGCAAAGGAGCCCCGTAC-3'	455

Tabla1: Los olinonucleótidos ADRJC1 y ADRJC2 corresponden a una secuencia del gen que codifica para la proteína exón de los capsómeros de Adenovirus⁽¹²⁾. AdnU-S' y AdnU-A son comunes para 14 serotipos⁽¹¹⁾. AdCF es común en el subgenero C y Ad1R, Ad2R y Ad5R son olinonucleótidos serotipo específicos encontrados en el gen que codifica para el filamento⁽¹³⁾.

Resultados:

Se encuestaron y revisaron 53 pacientes (73 ojos). Todos presentaron manifestaciones clínicas infección por adenovirus (Foto1 y 2). Quince pacientes tuvieron afectado el ojo derecho (28.3%), 18 el ojo izquierdo (33.9%) y 20 ambos ojos (37.74%). El promedio de la clasificación subjetiva de dolor fue de 4.06, (SD 2.94) fotofobia 4.30 (SD 2.98), ardor 4.58 (SD 3.20), prurito de 5.72 (SD 3.28). No se encontró una diferencia significativa entre ellos (Grafico 1).

PCR genérico: Muestras de 29 pacientes fueron positivas al PCR genérico para adenovirus. En la figura 1 se muestran el amplificado de 140pb, representativo de un resultado positivo para esta prueba. Al comparar las manifestaciones clínicas de ojo rojo, lagrimeo, ojo afectado, la presencia o ausencia de hemorragia subconjuntival, lagrimeo, adenomegalias, faringitis y sensación de cuerpo extraño, no se encontró una relación estadísticamente significativa con los datos de positividad al PCR genérico (Tabla 2 y 3). La presencia de quemosis, si tuvo una relación estadísticamente significativa con la presencia de adenovirus ($p < 0.01$) (Tabla2). Al relacionar manifestaciones leves y severas con los datos de positividad en el PCR genérico, sólo la quemosis severa tubo una relación estadísticamente significativa (P menor a 0.01) (Datos no mostrados).

Tipificación de adenovirus por Nest-PCR-RFLP. Este método permitió la identificación de Ad3 en 11 de las muestras positivas para el PCR genérico. La figura 2 muestra el resultado representativo del Nest-PCR de tres muestras. La figura 3 ejemplifica los productos del Nest-PCR tratados con las enzimas de restricción. Los perfiles de restricción obtenidos, sólo permitieron la identificación del serotipo Ad3. Los serotipos correspondientes al subgénero C no pudieron ser identificados debido a que el patrón de corte con las enzimas es similar para los adenovirus pertenecientes a este grupo, por lo que, se usó un PCR multiplex para reconocerlos.

PCR multiplex. Se pudieron identificarse dos serotipos Ad1 y dieciséis serotipos Ad2. La figura 4 muestra un ejemplo de los productos de amplificación obtenidos en esta prueba, en ella se observa un amplificado de 630pb y dos de 204pb correspondientes a Ad1 y Ad2. **En** el estudio estadístico de correlación de los datos clínicos con los serotipos identificados, no se encontró una significancia estadística (datos no mostrados), sin embargo, se pudo relacionar la existencia de faringitis en el cuadro clínico con los serotipos pertenecientes al subgénero C de adenovirus ($P < 0.05$)

Tabla 2.			
Categoría	Ad (+)	Ad (-)	Valor de X ²
Ojo Afectado			
OD	8	7	1.63
OS	8	10	p>0.1
AO	13	7	
Ojo rojo			
L	7	5	1.08
M	6	8	P>0.1
S	16	11	
Lagrimo			
L	6	7	1.30
M	4	5	P>0.1
S	19	12	
Quemosis			
L	7	13	7.01
M	10	8	P<0.01
S	12	3	

Tabla 2: Ad (+) positivo para PCR genérico, Ad (-) negativo para PCR genérico, OD = Ojo derecho, OS = Ojo Izquierdo, AO = Ambos ojos. L = Leve, M = moderado, S = Severo. La presencia de quemosis, dentro del cuadro clínico, representa una relación estadísticamente significativa (p<0.01) con los datos de positividad en el PCR genérico.

Tabla 3.			
Categoría	Ad (+)	Ad (-)	Valor de X ² .
Descarga Anterior.			
Si	11	9	0.001
No	18	15	P>0.1
Hemorragias SC.			
Si	6	3	0.62
No	23	21	P>0.1
Adenomegalias			
Si	8	10	1.16
No	21	14	P>0.1
Faringitis			
Si	9	10	0.645
No	20	14	P>0.1
SCE			
Si	16	14	0.053
No	13	10	P>0.1

Tabla 3: Ad (+) = positivo para PCR genérico, Ad (-) = Negativo para PCR genérico, SCE = Sensación de cuerpo extraño. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre los parámetros estudiados y la positividad de adenovirus por PCR genérico.

Conclusión:

Las conjuntivitis virales son las más frecuentes ⁽⁸⁾ A pesar de que se tratan de infecciones, autolimitadas, permaneciendo en promedio de 1 a 3 semanas; ⁽⁷⁾ no existe un tratamiento específico y efectivo para las conjuntivitis por adenovirus. Se han ensayado varios esquemas a base de antiinflamatorios no esteroideos, Corticoesteroides ⁽³⁾, lágrimas artificiales y estrategias terapéuticas generales como el uso de compresas frías y vasoconstrictores con el objetivo de disminuir la sintomatología. ^(3,7) Debido a que las molestias clínicas pueden llegar a ser discapacitantes, es importante la identificación etiológica para elaborar un buen plan de profilaxis. ^(3,11)

Siempre es deseable para un médico, poder correlacionar las manifestaciones clínicas de un paciente con la posible etiología de la enfermedad, esto permitiría un tratamiento rápido y efectivo, sin embargo, en un cuadro clínico por adenovirus no se conocen características patognomónicas de la infección. De las manifestaciones clínicas analizadas en nuestra población, podemos resaltar que la presencia de quemosis y la faringitis, fueron datos exploratorios que correlacionaron con una infección verdadera por adenovirus ($p < 0.01$ y $p < 0.05$). El resto de las manifestaciones clínicas investigadas no brindan orientación clínica para inferir la etiología. Por otro lado ya se ha reportado que una conjuntivitis folicular puede ocurrir como parte de un síndrome respiratorio-farínge o como una entidad separada ^(2,3,14), la enfermedad está frecuentemente acompañada de linfadenopatía ⁽⁸⁾. Epidemiológicamente, estas infecciones pueden ocurrir esporádicamente o causar enfermedad en un grupo numeroso de contacto. Los brotes esporádicos mas comunes son causados por Ad3 y Ad7 (subgénero B) pero otros serotipos tales como Ad1, Ad2, Ad4, Ad9-11, Ad15-17, Ad 20 y 22 (subgénero C,D y E), también pueden estar asociados con este síndrome ^(5,10). En este trabajo se pudo demostrar la presencia de Ad3 (subgénero B) reportado frecuentemente como un serotipo esporádico en períodos de verano ⁽¹⁰⁾, y de los serotipos Ad1 y Ad2 pertenecientes al subgénero C.

Llama la atención que la prevaencia reportada a nivel mundial de adenovirus, como agentes causales de las conjuntivitis foliculares, son mucho mayores que las encontradas en este estudio. Esto podría deberse a que el tamaño de la muestra es pequeño y a que México es considerado zona endémica para otros patógenos que afectan ojo tales como, Enterovirus y *Chlamydia trachomatis* ⁽¹⁵⁾, que pueden producir manifestaciones clínicas similares a los que producen adenovirus. Es importante resaltar que este es el primer reporte de un estudio de infección ocular por adenovirus en México; siendo nuestro instituto un centro de referencia, este trabajo es un indicador de los serotipos de adenovirus responsables de casos esporádicos en la población.

Bibliografía:

1. Adhikary AK, Inada T, Banik U, *et al.* Identification of subgenus C adenoviruses by fiber – based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:670.3.
2. Wu E, Trauger SA, Pache L, *et al.* Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol* 2004;78:3897.905.
3. Romanowski EG, Yates KA, Gordon YJ. Topical corticosteroids of limited potency promote adenovirus replication in the Ad5/NZW rabbit ocular model. *Cornea* 2002;21:289.91.
4. Uchio E, Ishiko H, Aoki K, *et al.* Adenovirus detected by polimerase chain reaction in multidose eyedrop bottles used by patients with adenoviral keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2002;134:618.9.
5. Chang CH, Sheu MM, Chern CL, *et al.* Epidemic keratoconjunctivitis caused by a new genotype of adenovirus type 8 (Ad8)-A chronological review of Ad8 in Southern Taiwan. *Jpn J Ophthalmol* 2001;45:160.6.
6. Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:4114.20.
7. Shiuey Y, Ambati BK, Adamis AP. A randomized, double-masked trial of topical ketorolac versus artificial tears for treatment of viral conjunctivitis. *Ophthalmology*. 2000;107:1512.7.
8. Uchio E, Takeuchi S, Itoh N, *et al.* Clinical and epidemiological features of acute follicular conjunctivitis with special reference to that caused by herpes simplex virus type 1. *Br J Ophthalmol* 2000;84:968.72.
9. Kowalski RP, Karenchak LM, Romanowski EG, *et al.* Evaluation of the shell vial technique for detection of ocular adenovirus. *Ophthalmology* 1999;106:1324.7.
10. Uchio E, Matsuura N, Takeuchi S, *et al.* Acute follicular conjunctivitis caused by adenovirus type 34. *Am J Ophthalmol* 1999;128:680.6.
11. Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, *et al.* Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2113.6.
12. Elnifro EM, Cooper RJ, Klapper PE *et al.* PCR and restriction endonuclease analysis for rapid identification of human adenovirus subgenera. *J Clin Microbiol* 2000;38:2055.61.
13. Adhikary AK, Inada T, Banik U, *et al.* Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:670.3.
14. Lukashok SA, Horwitz MS. New perspectives in adenovirus. *Curr Clin Top Infect Dis* 1998;18:286.304.
15. Thylefors B, Dawson CR, Jones BR, *et al.* A simple system for the assessment of trachoma and its complications. *Bull World Health Organ* 1987; 65(4): 477-83.