



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Viroloji Bilim Dalı

**ÇOCUKLARDA GÖRÜLEN ALT SOLUNUM YOLU
ENFEKSİYONLARINDA ADENOVİRUSLARIN
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. İmran SAĞLIK

Antalya, 2012



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Viroloji Bilim Dalı

ÇOCUKLARDA GÖRÜLEN ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA ADENOVİRUSLARIN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. İmran SAĞLIK

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Dilek ÇOLAK

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 2012

“Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011.04.0103.011 Proje No ile desteklenmiştir”

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında sürdürdüğüm “Viroloji Bilim Dalı” yan dal uzmanlık çalışmalarım süresince, tez çalışmam ve tüm eğitimim sırasında katkı ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Dilek ÇOLAK başta olmak üzere, yardımlarını ve desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Sayın Prof.Dr. S.Tümer VURAL, Sayın Prof.Dr. Meral GÜLTEKİN, Sayın Prof.Dr. M.Dilare ÖĞÜNÇ, Sayın Doç.Dr. Gözde ÖNGÜT, Sayın Doç.Dr. Derya MUTLU, Sayın Yrd.Doç.Dr. Betil ÖZHAK BAYSAL, Sayın Doç.Dr. Mete EYİGÖR’e ve Sayın Doç.Dr. Sadi KÖKSOY’a, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Sayın Prof.Dr. Filiz GÜNSEREN ve Anabilim Dalının diğer öğretim üyelerine, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalından Sayın Doç.Dr. O.Alphan KÜPESİZ ve Anabilim Dalının diğer öğretim üyelerine,

Çalışmalarım boyunca laboratuvar ortamında desteklerini gördüğüm Merkez Laboratuvarında görev yapan tüm çalışma ve asistan arkadaşlarıma, her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller ve Resimler Dizini	iv
Tablolar Dizini	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sınıflandırma	2
2.2. Virusun Yapısı	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Etik Kurul Onayı	17
3.2. Hastalar	17
3.3. Hücre Kültürü	17
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
3.5. Direkt Floresan Antikor Testi	19
3.6. İstatistiksel Çalışma	20
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR	34
7. ÖZET	35
8. ABSTRACT	36
9. KAYNAKLAR	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CAR	Hücre Yüzey Reseptörü
CMV	Sitomegalovirus
DNA	Deoksiribonükleik asit
EIA	Enzim Immuno Assay
EM	Elektron Mikroskopi
HEK	İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri
HEp-2	İnsan Larinks Epidermoid Kanser Hücresi
IEM	İmmün Elektron Mikroskopi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
UTM	Universal Transport Medium

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adenovirus yapısı	4
2.2. Viral replikasyon sırasında transkripsiyonu olan gen bölgeleri ve işlevleri	5

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Adenovirus pozitif DFA yayması (x20'lik büyütme).	26
4.2. Adenovirus pozitif DFA yayması (x40'lik büyütme).	26
4.3. Ekim yapılmamış A549 hücreleri (x40'lık büyütme).	27
4.4. Adenovirus üremiş ve FITC ile işaretli monoklonal antikorla boyanmış A549 hücresi (x40'lık büyütme).	27

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adenovirusların sınıflandırılması	2
2.2. İnsan adenoviruslarının özellikleri	3
2.3. Viralh DNA'nın genom üzerindeki mRNA sentez bölgeleri	5
4.1. Adenovirus pozitif ve negatif hastaların klinik bulgularının karşılaştırılması	22
4.2. Adenovirus pozitif örneklerde test sonuçlarının karşılaştırılması	23
4.3. PZR testinin hücre kültürüyle karşılaştırılması	24
4.4. DFA testinin hücre kültürüyle karşılaştırılması	24
4.5. Hücre kültürünün PZR ile karşılaştırılması	24
4.6. Adenovirus negatif ve pozitif hastaların radyoloji, laboratuvar ve uygulanan tedavi verilerinin karşılaştırılması	25

1. GİRİŞ

Adenoviruslar ilk kez 1953 yılında insan adenoid hücre kültüründen izole edilmişlerdir. İzolasyonlarından kısa bir süre sonra adenovirusların çocuklar ve askere alınan bireyler arasında daha sık olmakla birlikte, tüm bireylerde çeşitli enfeksiyonlara yol açtığı saptanmıştır (1). Adenovirus enfeksiyonları tüm yıl boyunca endemik olup, her yaşta görülmektedir. Virusun neden olduğu klinik tablolar arasında; kış ve bahar aylarında sıklıkla küçük çocuklarda görülen akut febril farenjit; yazın yüzme havuzlarından kaynaklanan faringokonjunktival ateş; yılın herhangi bir zamanında oftalmolojik işlemler, göz travmaları ve çevresel kirliliğin olduğu ortamlar ile ilişkili epidemik keratokonjonktivit; küçük çocuklarda gastroenterit; kışlar ve askeri birliklerde ortaya çıkan akut solunum hastalığı (trakeobronşit ve pnömoni) epidemileri; bronşit ve predispozan faktörlerin varlığında pnömoni; özellikle erkek çocuklarda hemorajik sistit sayılabilir (2). Bunların dışında adenoviruslar aseptik menenjit, ensefalit ve hepatit etkeni olarak da tanımlanabilirler. Ayrıca immün sistemi baskılanmış hastalarda bütün yaş gruplarında yaygın ve ağır seyreden enfeksiyonlara da neden olmaktadır (3,4).

2. GENEL BİLGİLER

Adenoviruslar; epiteloid hücrelerde akut litik enfeksiyon oluşturmalarının yanı sıra lenfoid hücrelerde latent olarak kalma, hayvanlarda tümör oluşturabilme, hücre kültürlerinde transformasyon meydana getirme kapasitesine sahip olmaları nedeniyle moleküler biyolojinin de araştırma konusu olmuşlardır. 1960'ların ortalarında bazı adenovirusların hayvanlarda tümör gelişimine neden oldukları saptanmış ve sonrasında bu alanda birçok çalışma yapılmıştır. Ancak virusun insanda kanserle bağlantısı ikna edici bulunmamıştır (1). Bölünmekte olan ve bölünemeyen hücreleri kapsayan geniş konak hücre spektrumuna sahip olmaları, hazırlanmaları ve saflaştırılmaları görece kolay olması nedeniyle günümüzde gen tedavilerinde vektör olarak kullanımları da oldukça yaygındır (5). Son olarak 2000'li yıllardan bu yana adenovirusların bazı serotiplerinin insan obezitesine sebep olduğu bulunmuş ve bu yönde çalışmalar yapılmıştır (6).

2.1. Sınıflandırma

İnsan adenovirusları yakın zamanda 5 cinse ayrılmış olan *Adenoviridae* ailesinin *Mastadenovirus* cinsinin bir üyesidir. Bu ailede yer alan diğer cinsler *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* ve *İchtadenovirus*'dur (Tablo 2.1). *Mastadenovirus* cinsi Yunanca meme anlamına gelen mastos kelimesinden gelir ve memelileri infekte eder. Yaklaşık 19 *Mastadenovirus* türünden 7'si insanları enfekte eder ve bu türler A'dan G'ye kadar belirlenmiştir (4,7).

Tablo 2.1. Adenovirusların sınıflandırılması (8).

Aile	Cins	Tip	Konakçı
<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirus</i>	Koyun adenovirus D	Omurgalı
	<i>Aviadenovirus</i>	Kümes hayvanı adenovirus A	Omurgalı
	<i>İchtadenovirus</i>	Balık adenovirus A	Omurgalı
	<i>Mastadenovirus</i>	İnsan adenovirus C	Omurgalı
	<i>Siadenovirus</i>	Hindi adenovirus B	Omurgalı

Bugüne kadar insan adenovirusları (*Mastadenovirus*) farklı özellikleri göz önünde bulundurularak çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır. İnsan, sıçan ve maymun eritrositlerini aglütine etme yeteneklerine göre, rodentlerde tümör oluşturma

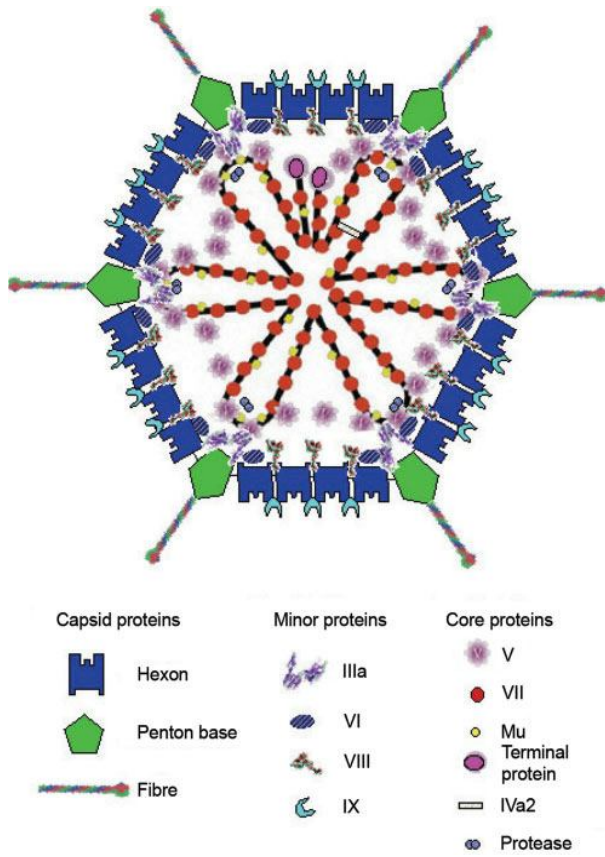
özelliklerine göre, restriksiyon enzimleriyle kesimleri sonrası oluşan paternlere göre, viral DNA'nın G+C oranına göre ve DNA dizi homolojilerine göre, yapılan çeşitli sınıflandırmalar mevcuttur. Bu gün için insan adenoviruslarının nükleotid dizi analizine göre A'dan G'ye kadar yedi türü (farklı kaynaklarda “grup”, “alt grup” ya da “alt cins” olarak da geçmektedir) ve fiber antijenlerindeki varyasyona göre 52 serotipi tanımlanmıştır (Tablo 2.2) (2,3,8).

Tablo 2.2. İnsan adenoviruslarının özellikleri (4,9,10).

Grup	Serotip	Onkogenik özellik	DNA'nın % G+C oranı	Hemaglütinasyon		Fiber uzunluğu (nm)
				Maymun	Sıçan	
A	12,18,31	Yüksek	48-49	-	±	28-31
B1	3,7,16,21,50	Zayıf	50-52	+	-	9-11
B2	11,14,34,35	Zayıf	50-52	+	-	9-11
C	1,2,5,6	Yok	57-59	-	±	23-31
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-4, 51	Yok	58	±	+	12-13
E	4	Yok	57-61	-	±	17
F	40,41	Yok	57-59	-	±	~29
G	52	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi

2.2. Virusun Yapısı

Adenoviruslar orta büyüklükte, 70-90 nm çapında, zarfsız, ikozahedral yapıda çift zincirli DNA içeren viruslardır. Her bir partikül yaklaşık 40 genden oluşan, 36 kb'lık, tek, doğrusal DNA molekülü içerir. Virion 252 kapsomerden oluşur ve bu kapsomerlerden 240'ı eşkenar üçgen yüzleri, 12'si ise köşeleri oluşturur. Eşkenar üçgen yüzleri oluşturan kapsomerler hekzon, köşeleri oluşturan kapsomerler ise penton adını alır. Penton kapsomeri 2 yapısal kısımdan oluşur. Bunlardan köşede bulunan kapsomer alt yapısı “penton baz” ve bunlardan çıkan uzantı “fiber” olarak adlandırılır. Fiber yapısı virusun hücreye bağlanmasını sağlar (3,11) (Şekil 2.1). Adenovirusların dış yüzeyinde bulunan bu yapısal elemanlar şeklen oldukları gibi birbirlerinden antijenik yapı olarak da farklıdır. Hekzon antijenleri gruba özgüdür örneğin insan adenovirusları için ortakdır; penton antijenleri ise tüm adenoviruslar için ortaktır. Fiber antijenleri ise serotipe özgüdürler ve hemaglütinasyondan sorumludurlar (ancak çapraz reaksiyon görüldüğünden hekzon antijenleri kadar özgün değildirler) (3,4,9).



Şekil 2.1. Adenovirus yapısı (9).

Replikasyon

Adenoviruslar, enfekte ettikleri hücrelerin nükleuslarında replike olarak nükleus içinde bazofilik inklüzyonların oluşmasına neden olurlar. Replikasyon 6. saat içinde başlar ve 20-24 saatte tamamlanır. Adenovirusların hücreye girişi önce fiber proteininin hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunması, ardından penton baz proteinlerinin α/β integrinlere bağlanmasıyla başlar. Çeşitli hücrelerde (akciğer, trakea, kornea, bağırsak, kalp ve karaciğer gibi) birçok adenovirus türü için (A,C,E ve F) major reseptör CAR (coxackievirus-adenovirus receptor) iken, bazı türler (D ve F) başka reseptörlerle hücreye bağlanırlar (2,10). Birçok dokuda bulunan bu hücre yüzey reseptörü (CAR) ile bağlanma sonucu reseptöre bağımlı endositozla virus hücre içine girer. Endozom içinde asidik ortam oluşması ve viral proteinlerin toksik etkisi ile endozom membranının harabiyeti sonucu sitoplazmaya geçer (2). Fiber ve penton antijenlerinden ayrılarak kısmen soyunan nükleokapsid, hücrenin transport sistemi ile (hekzon antijeni ile mikrotübüllere bağlanarak) nükleus membranına taşınır ve viral DNA nükleer porlardan geçerek hücre çekirdeğine girer. Burada viral genlerin transkripsiyonu iki aşamada gerçekleşir. Önce sentezlenen en erken ve erken

Epidemiyoloji

Adenovirus enfeksiyonları tüm dünyada epidemik, endemik veya sporadik olarak tüm yıl boyunca (kış ve bahar aylarında daha sık) ve her yaşta görülebilmektedir. Tüm akut solunum yolu enfeksiyonlarının %2-3'ü ve akut ishalli enfeksiyonların %5-15'i adenoviruslara bağlıdır (14). Adenoviruslarla ilişkili üst solunum yolu enfeksiyonları soğuk algınlığı, farenjit ve tonsillit şeklinde görülmekte olup, özellikle 1'den 7'ye kadar olan serotiplerle ilişkilidir. Tip 1, 2, 5 ve 6 ile oluşan enfeksiyonlarda dikkat çekici diğer bir özellik, yaklaşık %50 olguda virusun adenoid ve tonsiller dokuda latent durumda kalması ve uzun süre intermittan olarak dışkı ile atılmasıdır. Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonları adenovirus enfeksiyonuna bağlı sık görülen komplikasyonlardır. Özellikle toplu yaşam koşullarında (okul, yurt, askeri birlik, yenidoğan üniteleri gibi) salgınlara neden olabileceği bilinmektedir. Bu durumun özellikle 3, 4, 7 ve 21 serotipleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (1). Özellikle 6 ay-5 yaş arasında çocuklarda enfeksiyon görülme sıklığı daha fazladır; 6 - 12 ay arası çocukların %33'ü en az bir kez virusla karşılaşmıştır (3) ve 5 yaşındaki çocukların %75'i serolojik testlerle pozitifdir (3,11,14). Çocukluk çağı pnömonilerinin %10'undan adenoviruslar sorumlu tutulmaktadır (15).

Coğrafik dağılıma göre farklılıklar görülse de klinik örneklerden en yaygın izole edilen serotipler C grubu (tip 1, 2 ve 5), B grubu (tip 3, 7) ve gastroenteritlerde ise tip 40 ve 41'dir. Göz enfeksiyonlarına yol açan serotipler (8,19,37) hijyenik koşulların sağlanmadığı yüzme havuzlarından kaynaklanan enfeksiyonlar sık görülmekte, bazen kontamine aletlerin kullanımı nedeniyle nazokomiyal enfeksiyon olarak da karşımıza çıkabilmektedir (3).

Virionlar kuruluğa, deterjanlara, gastrointestinal sekresyonlara (asit, proteaz ve safra) dayanıklı olduğundan fekal-oral yolla, kontamine eller ve aletlerle ve iyi klorlanmamış yüzme havuzları ile kolayca yayılır. İnsandan-insana başlıca solunum yoluyla ve fekal-oral kontaminasyonla bulaşır. Hayvan rezervuarı yoktur (3,11). Adenoviruslar oda ısısında 3 haftaya kadar enfeksiyöz kalabilirler. Virus 56°C'de 30 dakikada, 0.5 µg/ml konsantrasyondaki serbest klor varlığında, ultraviyole ışınlaması ile %70 etanolle 1 dakikalık muamele ile inaktive olur. Özel önlemlere gereksinim kalmadan liyofilize edilebilirler ve infektivitelerini 4-10°C'de korurlar (14,16,17).

Patogenez

Genellikle viral partikülleri içeren damlacıklarla bulaşarak orofarinks epitel hücrelerini enfekte eden viruslar burada replike olarak enfeksiyona yol açar ve lokal yayılımla tüm solunum yolu hücrelerini enfekte edebilirler. Ya da kontamine el veya aletlerle solunum, göz, sindirim ve idrar yolları muköz membranların epitel hücrelerini enfekte edebilirler (2). İnkübasyon periyodu 2-15 gün (ortalama 10 gün) arasında değişir (3). Adenovirüsler hücrelerde litik (mukoepitelyal hücrelerde), latent (lenfoid ve adenoid hücrelerde) ve transformasyona neden olan (farelerde, insanda yok) enfeksiyonlar oluşturabilirler (11). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testleri ile sağlıklı yetişkinlerin yarısında akciğer dokusunda, üçte birinde duodenum epitelinde adenovirüs DNA'sı saptanmıştır (3).

Enfeksiyonlarda sıklıkla bölgesel lenf nodları da tutulur ve lenfadenopati görülür (2). Akciğerlerde histopatolojik olarak yaygın interstisyel pnömoni; bronş epitellerinde nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonları; mukoz glandlarda fokal nekroz ve hyalen membran oluşumu gözlenir. Işık mikroskopuyla DNA ve proteinden oluşan intranükleer inklüzyonlar görülebilir. Bu tür inklüzyonlar CMV'de de görülür ancak Adenovirüsler farklı olarak hücreyi büyütmezler (3,11).

Konak hücrede makromolekül sentezinin inhibisyonu sonucu hücrenin hasarına ve ölümüne yol açarlar. Adenovirüs yapısal proteinlerinden olan penton direkt olarak hücrelere sitotoksik etki yapar (3). Özellikle immündefektif hastalarda virüsün lokal olarak replikasyonu sonrasında veya latent virüsün reaktivasyonu sonrasında sistemik enfeksiyonlar görülebilir. Bu enfeksiyonlarda mortalite oranı yüksek olup, %50-70 olarak belirtilmektedir. T hücre ilişkili immün yanıt akut enfeksiyonun iyileşmesinde önem taşımakta olup özellikle hücresel immün yanıtı düşük olan hastalarda sistemik enfeksiyon riski artmaktadır (4).

Adenovirüslerin oluşturduğu hastalıklar

Adenovirüslerle ilişkili hastalıklar farklı serotiplere göre ve farklı doku tropizmine göre değişen geniş bir spektruma sahiptir. İnsanlarda genellikle solunum yollarını, gastrointestinal sistemi ve gözü etkilerler ancak idrar yolları, kalp, merkezi sinir sistemi, karaciğer, pankreas ve genital sistem tutulumu da yapabilirler. Ayrıca günümüzde bazı adenovirüs türlerinin obeziteyle ilişkili olduğu da düşünülmektedir (6).

Akut febril farenjit

Sıklıkla bebek veya küçük çocuklarda görülür. Farenjit yada tonsillit şeklinde karşımıza çıkar. Ateş, öksürük, nazal konjesyon, burun akıntısı ve boğaz ağrısı mevcuttur. Klinik bulgular 3-5 gün sürer ve kendiliğinden iyileşir. Diğer viral enfeksiyonlardan ve streptokokal farenjitten ayırımı güçtür. Bu tabloda genellikle adenovirus tip 1, 2, 3, 5, 6 ve 7 sorumludur. Virus çocukların %50'sinde adenoid dokuda ve/veya lenf nodlarında latent olarak kalır ve uzun süre dışkı ile atılır (2,9).

Faringokonjunktival ateş

Akut febril farenjit bulgularına konjonktivit de eklenirse tablo faringokonjunktival ateş adını alır. Çocuklar arasında zaman zaman epidemiler halinde görülür. Yaz kampları veya tatil köylerinde salgınlar şeklinde ortaya çıkabilir. Adenovirus tip 3 ve 7 (tip 4, 14 daha az) faringokonjunktival ateşe sebep olmaktadır (9). Sıklıkla periauriküler lenfadenopati vardır. Konjonktivit genellikle tek taraflıdır ve klinik olarak diğer etkenlerden (bakteriyel, alerjik veya viral) ayırt edilemez. Hafif göz ağrısı, kaşıntı ve çapaklanma görülür. Hastalık genellikle tedavi gerektirmez ve 1-2 haftada kendini sınırlar (3).

Akut solunum yolları hastalığı

Akut trakeobronşit ve pnömoni ile karakterizedir. Kalabalık ve yoğun yaşamın olduğu yerlerde özellikle askeri birliklerde (ilk kez 1954'de tanımlandı) ortaya çıkar ve salgınlara yol açar. Bu gruplar dışında erişkin yaş grubunda pek sık enfeksiyon etkeni değildir (3). Semptomlar diğer viral etkenlere bağlı respiratuvar enfeksiyonlara benzer; tonsillitle birlikte farenjit, ateş, baş ağrısı, öksürük, bronşiti ve pnömoniyi içerir. Pnömoni genellikle enfeksiyonun komplikasyonu olarak karşımıza çıkar. Akut solunum yolları hastalığına tip 3, 4, 7, 14 ve 21 neden olabilir (15). Başlıca sebep olan adenovirus tip 4 ve 7 için 1971 yılında enterik kaplı tabletler şeklinde hazırlanan canlı virus aşısı askeri birliklerde kullanılmak üzere rutin olarak uygulanmaya başlanmıştır (18). Mart 2011 tarihinde ise yeni bir canlı, atenüe olmayan aşı 17-50 yaş arası askeri personele uygulamaya yönelik ABD'nde onay almış ancak çocuklara ve sivillere endikasyon olmadığı için uygulama alanı askeri personelle sınırlı kalmıştır (2).

Göz enfeksiyonları

Adenovirüsler akut konjunktival enfeksiyonların en yaygın sebebidir. Dört adet sendroma yol açar: Akut folliküler konjunktivit, epidemik keratokonjunktivit, faringokonjunktival ateş ve respiratuvar hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkan konjunktivit.

Akut folliküler konjunktivit gözlerde kızarıklık, kaşınma, yanma, batma ve sulanma ile seyreder ve bir hafta içinde kendiliğinden düzelir. Sporadik olarak veya salgın şeklinde görülebilir. Epidemik keratokonjunktivit sıklıkla tip 8, 19 ve 37'nin neden olduğu göreceli olarak daha hafif semptomlarla başlayan ancak 1-2 hafta sonra keratit gelişen ve 1-2 yıl süren bir enfeksiyondur (4,14). Endüstriyel alanlarda çalışanlarda (gemi yapım tezgahları gibi), toz ve travmaya maruz kalanlarda, göz kliniklerinde (kontamine aletler ve ellerle bulaş), kamplarda sıktır. Gözlerde ve göz kapaklarında şişme, kızarıklık, gözlerde ağrı, batma ve fotofobi sonrasında enfeksiyon iki hafta içinde iyileşebilir veya uzun süren subepitelyal keratit ve korneal opasiteler sonucu görme bozukluklarına yol açabilir (3,14).

Gastrointestinal sistem hastalıkları

Çocuklardaki gastroenteritlerin rotavirüslerden sonra ikinci sıklıkla viral etkeni adenovirüslerdir. Gastroenterit nedeni ile hastaneye yatan çocuklarda %4-15 oranında etken olarak saptanmıştır (3,19). Sıklıkla tip 40 ve 41 (nadiren 31) etken olarak karşımıza çıkar. Yaz aylarında daha sıktır. Klinik olarak ishal, ateş ve kusma ile karşımıza çıkar ve genellikle 1 haftada kendiliğinden iyileşir (3,14).

Diğer Hastalıklar

Erkek çocuklarda akut başlangıçlı hematüri, dizüri ve poliüri ile karakterize hemorajik sistitlerde adenovirüsler etken olarak saptanmıştır. Yine immüdüşkün hastalarda da (kemik iliği veya solid organ transplantasyonu sonrası) hemorajik sistit ortaya çıkabilir ve disseminasyonun ilk belirtisi olabilir. Bu grup hastalarda pnömoni, hepatit, kolit, pankreatit ve sonrasında virüsün sistemik yayılımı görülebilir. Bu hasta grubunda dissemine hastalığın mortalitesi %50-70 olup oldukça yüksektir (4).

Tanı

Klinik olarak diğer viral ve/veya bakteriyel enfeksiyonlardan ayırımı zor olduğundan tanı için laboratuvar testlerine ihtiyaç vardır. Özellikle salgın şeklinde enfeksiyonlar görüldüğünde etkenin erken tanımlanması önemlidir (14). Enfeksiyonlarda tanı genellikle hücre kültüründe virusun izolasyonu, antijen veya genomun saptanması gibi direkt yöntemlerle yapılmaktadır. Elektron mikroskopu klinik laboratuvarlarda pek kullanılmaz. İndirekt tanı ise (seroloji) duyarlılığının düşük olması ve yetersiz antikor yanıtı (özellikle immüdüşkün hastalarda) nedeniyle tercih edilmez. Hücre kültürü ise zaman alıcı ve zahmetlidir (4). Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelerle PZR yöntemi ile viral DNA tespiti hızlı ve duyarlı şekilde yapılabilir hale gelmesi bu yöntemin tanı laboratuvarlarında yaygınlaşmasına neden olmuştur (20).

Adenovirusların tiplendirilmesi başlıca epidemiyolojik araştırmalar, patogenez çalışmaları veya özellikle ciddi, olağan dışı bir enfeksiyonun nedenini açığa çıkarılması için kullanılır. Serolojik veya moleküler tiplendirme uygulanabilir. Serolojik tiplendirme lif geni ve hekzon geni üzerindeki epitoplardaki farklılıkları saptar. Moleküler tiplendirmede ise lif geni ve hekzon genindeki DNA sekans farklılıkları belirlenir (1).

Virusun izolasyonu

Adenoviruslar dışkı, boğaz sürüntüsü, nazofarengial aspirat, konjunktiva sürüntü ve kazıntı örnekleri, idrar, BOS ve çeşitli biyopsi örneklerinden izole edilebilirler. Örnek hastalığın klinik bulgularına bağlı olarak virus miktarının en fazla olduğu bölgeden alınmalıdır. Birçok adenovirus enfeksiyonunda dışkı ile virus atılımı olduğundan dışkı pratik bir tercih olabilir ancak virusun dışkı ile atılımı aylarca sürebildiğinden izolasyonu her zaman enfeksiyon etkeni olduğunu göstermez. Klinik bulguların başlangıcından sonra bir hafta içinde örnek alınmalıdır. Zamanla virus miktarı azalacağından izolasyon şansı da azalacaktır (3).

Hücre kültürü

Tanıda altın standart yöntem hücre kültürü olarak kabul edilmektedir. Serotip 40-41 hariç tüm adenovirus serotipleri hücre kültürlerinde kolayca ürer ve sitopatik etki oluşturur. Bu amaçla insan akciğer karsinom hücre (A549) dizisi, insan larinks

epidermoid kanser hücresi (HEp-2), insan serviks kanser hücresi (HeLa) kullanılabilir. Enterik adenoviruslar (tip 40-41) en iyi adenovirus tip 5 ile transforme insan embriyonik böbrek hücrelerinin (HEK) sürekli bir dizisi olan Graham 293 hücrelerinde ürer (21). A 549 hücre dizisi üreme zamanı ve izole edilen virus miktarı dikkate alındığında daha kısa sürede daha yüksek miktarda üreme sağlamaktadır (22,23).

Adenoviruslarla enfekte hücrelerde virusun çoğalmasına bağlı olarak genellikle tek tabaka hücrelerin kenarından başlayan hücrelerin yuvarlaklaşması, genişlemesi ve üzüm salkımı şeklinde bir araya toplanması (agregasyonu) şeklinde sitopatik etki oluşması tipiktir (3). Sitopatik etki genellikle 2-7 günde ortaya çıkar ancak virus konsantrasyonuna bağlı olarak 21 güne kadar beklemek gerekmektedir (4,11,24). Hücre kültürlerinde sitopatik etkinin saptanması, virusun ürediğini göstermekle birlikte virüsü tanımlamaz. Üreyen virusun tiplendirilmesi için gruba veya tipe özgül antikorlar kullanılarak nötralizasyon veya floresan antikor testleri uygulanmalıdır. Hücre kültüründe iyi sonuç alınabilmesi, örneklerin uygun şekilde alınması, uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi, virusların aktivite kaybına uğramaması için örnek alımı ile kültür ekimi arasındaki sürenin uzun olmaması gibi pek çok faktöre bağlıdır. Sürüntü ve biyopsi örnekleri bir transport besiyeri içinde taşınmalıdır ancak dışkı ve BOS örnekleri steril bir kapta taşınabilir. Adenoviruslar optimum üreme için +4°C'de veya buz üzerinde taşınmalıdırlar ancak dış ortam koşullarına göreceli olarak dayanıklı olduklarından oda ısısında taşındıklarında bile kültürde üreyebilirler. Aynı zamanda bakteriyel kontaminasyon ya da örneğin kendi toksik etkisine bağlı olarak virus izolasyonunun engellenmesi hücre kültürünün bir diğer kısıtlayıcı yönüdür. Ayrıca adenovirusların klasik hücre kültüründe çoğalabilmeleri için örnek içindeki virus konsantrasyonuna bağlı olarak 3-21 gün gibi uzun bir zamana gereksinim duyulmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde klasik hücre kültürü yönteminin tanısıl amaçlı kullanımı oldukça kısıtlıdır (3,24).

Birçok klinik tanı laboratuvarında klasik hücre kültürünün yerini daha kısa sürede sonuç veren "shell-vial" yöntemi almıştır. Bu yöntemde içinde bir lamel içeren düz tabanlı tüpler kullanılır. Lameller üzerinde üretilmiş tek tabaka hücre kültürlerine ekilen örnekler santrifüj edilerek hücrelere virusun inokülasyonu sağlandıktan sonra 2-3 gün inkübe edilir sonrasında lameller hekson antijenine karşı monoklonal antikorlar kullanılarak immünfloresan ya da immünperoksidaz yöntemiyle boyanarak

incelenir. Böylece sitopatik etki oluşumu beklenmeksizin, hücre içinde oluşan erken viral proteinler saptanabilir.

Ondört gündeki tüp kültürüyle karşılaştırıldığında, adenovirusların shell vial yöntemi ile 2 günde boyanarak saptanma duyarlılığı %50 ile %85 arasındadır. Bu saptama oranı, birçok diğer solunum virusu için daha azdır. Maksimal adenovirus üretimi için, tüp kültürü veya shell vial kültürün 5 günde boyanması önerilir (1).

Antijen saptanması

Solunum ve gastrointestinal enfeksiyonların tanısında direkt antijen saptanması yaygın şekilde kullanılmaktadır. Adenoviral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında da antijen tespiti yapılabilmesine karşın bu yöntemlerin duyarlılığı diğer solunum yolu viruslarına göre daha düşüktür (%40-60) (2,25).

Ancak örneğin değerlendirilmesini kolaylaştıran ve hücre yeterliliğini arttıran sitosantrifügasyon yöntemi kullanılarak daha yüksek (%70-75) duyarlılık elde edilebilir (26). En iyi duyarlılık için hastalığın başlangıcından itibaren 4-5 gün içinde örnek alınmalıdır (3,4).

Antijen saptanması için solunum yolu örneklerinde, sürüntü ve biyopsilerde immünfloresan, fekal örneklerde ise enzim immüno-assay kullanımı yaygındır. Grup spesifik hekson antijenine karşı monoklonal veya poliklonal antikorlar ticari olarak mevcuttur. İmmünofloresan yöntemde çalışma, hücrelerin lam üzerine çöktürülmesi, asetonla fikse edilmesi, florokrom işaretli monoklonal antikor ile boyanması ve floresan mikroskop altında incelenmesi şeklinde uygulanır. Pozitif hücreler, koyu nükleer veya granüler stoplazmik boyanma sergilemelidir.

Kültürde üreyen adenovirusların erken dönemde saptanması için de immünfloresan yöntemden yararlanılabilir.

Enterik adenoviruslar kültürde iyi üremediğinden tanıda antijen saptanması tanıda daha geniş yer bulmuştur. Bunun için genellikle lateks, immünokromatografi veya enzim immünoassay yöntemlerinden yararlanılır. İmmünokromatografi yönteminde örnek membran strip boyunca lateral olarak göç eder, antijen virus spesifik antikorlara bağlanır ve dakikalar içinde renkli çizgi gelişir. Az sayıda örnek için uygundur ve 5-10 dakikada sonuç verir. Enterik adenovirusların tanısında kullanımı yaygın olup duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir (%93-%100) (19). İmmünokromatografi yönteminin solunum yolu örneklerinde adenovirusların

tanısında kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalarda duyarlılığı ve özgüllüğü %72-90 ve %100 bulunmuştur (27,28).

Nükleik asit tayinine yönelik testler

Nükleik asit dizilerinin tayinine yönelik moleküler testler; yüksek duyarlılıkları, çok sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi, örneklerin uygun koşullarda uzun süre saklanabilmesi ve kısa sürede sonuç vermeleri gibi avantajlarından dolayı, diğer birçok enfeksiyonda olduğu gibi adenovirus enfeksiyonlarının tanısında da tercih edilir olmuştur. Viral genomun amplifikasyonu ve saptanması oldukça duyarlı bir yöntemdir, ayrıca viral yük çok düşük olduğunda kültüre göre avantaj sağlar. Nükleik asit tayinine yönelik bazı çalışmalarda, bu testler kültürle kıyaslandığında %100 duyarlı ve özgül bulunmuştur (4,29).

Ancak virusun enfeksiyon sonrasında latent olarak kalması ve bu yüzden PZR testleri ile non-enfeksiyöz virionların da saptanması mevcut enfeksiyon etkeninin belirlenmesinde kafa karıştırıcı olabilir. Testlerde kullanılan PZR primerleri serotipler arasında iyi korunmuş olan hexon geni, fiber geni veya virusla ilişkili RNA I ve II bölgelerine yönelik seçilmektedir (4). Örnek seçimi diğer tanı yöntemlerinde olduğu gibi klinik bulgulara göre değişmekte olup, disemine olgularda kan (plazma veya serum), diğer olgularda enfeksiyon bölgesinden alınan örnekler çalışılmalıdır (30).

Gerçek zamanlı PZR'lar daha az iş yükü ve daha az kontaminasyon ile birlikte saatler içinde kalitatif ve kantitatif sonuçlar sağlar. Bir real-time testinde adenovirusların tüm serotiplerinin saptanması için birden fazla primer ve prob seti gerekebilir. Günümüzde kantitatif real time PZR'ın birkaç sınırlaması vardır. Birincisi testin kalibrasyonu ve laboratuvarlar arasında karşılaştırmada uluslararası bir standardın olmamasıdır. İkincisi tüm serotiplerin uniform olarak saptanması ve kantitasyonu için uluslararası olarak kabul edilmiş bir primer prop kombinasyonu olmamasıdır. Bunun için mutlak viral yükleri raporlamaktansa, viral kinetikleri (zamanla adenoviral yükteki relatif değişikliği) raporlamak tercih edilebilir (4,31).

Seroloji

Serolojik tanı IgM yanıtının saptanması veya akut ve konvelasan serum örnekleri arasında IgG'de en az dört kat titre artışının gösterilmesine dayanmaktadır. Klinik çalışma amacıyla kompleman fiksasyon veya Enzim Immuno Assay (EIA)

gibi bir test seçilir. Her iki yöntem de hekzon antijenini kullanır. Kompleman fiksasyon testinin duyarlılığı %50-70, EIA testinin duyarlılığı %70-80 arasında değişir (3). Duyarlılık enfekte eden virusa ve antijen olarak kullanılan serotipe göre değişir. Rutin tanıda daha çok EIA testleri tercih edilmektedir.

Serotip spesifik antikor testleri tanısal çalışmalarda pek kullanılmaz. Bu testler, viral izolatların elde bulunmadığı durumlarda enfeksiyonlardan sorumlu serotiplerin belirlenmesi, sınırlı sayıdaki serotiple ilişkili hastalıkların tanısı ve immün yanıtla ilgili çalışmalarda değerlidir. Bu amaçla nötralizasyon ve hemaglutinasyon testlerinden yararlanılır. İmmüdüşkün hastalarda ise serolojik tanının yeri yoktur (2).

Elektron mikroskopi

Klinik örnekte adenovirus partikülleri veya hücre çekirdeğinde olgunlaşmış virusların oluşturduğu kristal yapılar elektron mikroskopi (EM) veya daha hassas ve özgül olan immün elektron mikroskopi (IEM) ile saptanabilir (13). Tespit edilmiş doku parçaları ince kesitlere ayrılarak negatif boyanır ve genellikle nükleus içinde bulunan virus partiküllerinin kristal dizeleri EM ile incelenir. Sıvı ise yavaş-hızla santrifüjleme ile arındırıldıktan sonra aynı şekilde boyanır ve EM'de partikül kümeleri incelenir. EM bölmeleri üzerine virusun ultrasantrifüjlenmesi, antihekzon antikorlar ile virusun ön agregasyonu veya diğer konsantrasyon teknikleri kullanıldığında duyarlılık artar (32). EM oldukça spesifik ve güvenilir bir yöntemdir ancak diğer yöntemler daha duyarlı ve pratik olduğundan günümüzde bu yöntem pek tercih edilmemekte; ancak çeşitli araştırma laboratuvarlarında ve bazı merkezlerde viral yükün fazla olduğu gastroenteritlerde kullanılmaktadır (4,19).

Tiplendirme

Temel olarak epidemik, patogeneze ve tedavi yaklaşımları ile ilgili çalışmalarda yapılmaktadır. Başlangıçta insan ve bazı hayvan eritrositlerini aglutine etme özelliklerine göre yapılan tiplendirme çalışmaları günümüzde moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Multipleks PZR ile çoğaltılan ampikonlar tür spesifik problemlerle saptanarak tip tayini yapılabildiği gibi; sekanslama yöntemi ile veya restriksiyon enzim analizi ile de tiplendirme yapılabilir. Birçok laboratuvar tiplendirme için bu tür yöntemleri kullanmaktadır. Bu testlerde temel olarak önce hexon veya fiber geni primerleri ile ekstrakte DNA'nın amplifikasyonu (ortak veya tip spesifik PZR ile)

yapılır. Ardından ürünün uzunluğu, boyutu ölçülerek, DNA sekanslama işlemi yapılarak veya restriksiyon enzimleri ile DNA fragmanlara ayrılarak tip tayini yapılır (4). Hexon geni sekanslama yöntemi ve klasik serolojik tiplendirme yöntemleri kıyaslandığında aralarındaki korelasyon %71 ile %97 arasında değişir (33,34).

Tedavi

Tedavide kullanılan özgül bir antiviral ilaç yoktur; semptomatik tedavi uygulanır. Adenovirus enfeksiyonları genellikle kendiliğinden iyileşir. Ancak immüdüşkün hastalarda dissemine enfeksiyon sık görüldüğünden tedavi seçenekleri değerlendirilir. Tedavide gansiklovir, vidarabin, ribavirin ve sidofovir gibi antiviral ilaçlar tercih edilebilir. İmmüdüşkün hastalardaki çalışmalar sidofovir ve ribavirin üzerine yoğunlaşmıştır.

Ribavirin bir pürin nükleozid analogu olup, RNA capping aktivitesinin inhibisyonu, viral polimerazların direkt inhibisyonu ve yeni sentezlenen DNA'da mutasyona yol açma gibi mekanizmalarla etkili olur. En sık görülen yan etkisi geçici anemidir (4). Adenovirusların neden olduğu hemorajik sistit, pnömoni, gastroenterit ve hepatit olgularında tedavide başarılı olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi, (35,36) başarısız olduğunu bildiren çalışmalar da (37,38) yayınlanmıştır. Başarı oranının erken dönemde tedaviye başlama ve etkenin serotipi gibi nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Yine son dönemde invitro olarak yapılan bir çalışmada ribavirinin sadece C grubundaki suşlara (serotip 1, 2, 5 ve 6) etkili olduğu yayınlanmıştır (39).

Cidofovir geniş antiviral etki spektrumuna sahip asiklik nükleozid fosfat analogudur. Viral DNA'ya entegre olarak zincirin uzamasını inhibe eder. Tüm Adenovirus serotipleri ilaca invitro olarak duyarlıdır. Ciddi yan etkileri olmasına rağmen (nefrotoksisite, myelosüpresyon ve üveit) transplant sonrası gelişen Adenovirus enfeksiyonlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (4). Çok merkezli bir çalışmada farklı klinik bulguları olan hastalarda %69 tedavi başarısı bildirilmiştir (40).

Başka bir çalışmada yakın takip, klinik bulgular ve viral yüke bakılmaksızın katı bir tedavi uygulaması ile bu oran %98'e çıkmıştır (41).

Hastalığın ve hastaların iyileşme sürecinde immün yanıt önemli olup viral yükün azalması ile lenfosit miktarı ve CD4 miktarı arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır (42).

İki veya daha fazla bölgeden alınan örnekte pozitiflik saptanması durumunda; hastanın immünsüpresyonu azaltılamıyorsa veya hasta ciddi lenfopenik ise antiviral tedavi gündeme gelmektedir. Yine hastanın kan örneğinde yüksek viral yük saptanması da dissemine enfeksiyona işaret ettiğinden tedaviye başlamak için bir gösterge olarak kabul edilmektedir (43).

Korunma

Adenovirus enfeksiyonlarından ve daha da önemlisi salgınlarından korunmanın en güzel yolu kalabalık yaşam alanları, ortak kullanılan tıbbi aletler veya eşyalar ve havuzların hijyenik koşullara uygun olmasının sağlanmasıdır. İmmünizasyon etkili bir yöntem olmakla birlikte ekonomik zararlar ve iş gücü kaybı da göz önünde bulundurularak sadece askeri personele uygulanması onay almıştır. Ayrıca uygulanan aşı canlı aşı olduğundan (immün düşkün hastalarda ve yenidoğanlarda) uygulanması kısıtlıdır.

Çalışmanın amacı

Bu çalışmanın amacı alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı alan çocuklarda Adenovirus enfeksiyonu sıklığının hücre kültürü ve PZR yöntemleri ile araştırılması ve hastaların değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 14.01.11 tarihinde B.30.2.AKD.0.20.05.05/10 sayılı kararla onaylanmıştır.

3.2. Hastalar

Ocak 2011 ve Nisan 2012 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri bölümünde alt solunum yolu enfeksiyonu (bronşit, bronşiolit, pnömoni) tanısı alan 0-5 yaş arasındaki 206 hasta çalışmaya alındı.

Hastalar rastgele olarak seçildi ve çalışma prospektif olarak yürütüldü. Örnek alımı sırasında eş zamanlı olarak hasta yakınlarından ve dosyalarından elde edilen veriler kaydedildi. Bu aşamada ulaşılamayan veriler ise daha sonra hasta dosyaları taranarak ve hastane veri sistemi olan MEDİ-LİS'den de yararlanılarak elde edildi. Alt solunum yolu enfeksiyonu varlığı öksürük, hırıltılı solunum, ateş yakınmaları ve muayenede solunum sıkıntısı, taşipne, oskültasyonla patolojik solunum sesi varlığı (ekspiryum uzunluğu, ral ve ronküs), direkt akciğer grafisinde patolojik görünüm ve laboratuvar bulguları (CRP, lökosit ve lenfosit) ile belirlendi.

Hastalardan içerisinde bir adet esnek naylon flocked swab (eküvyon) ve 3 ml viral taşıma besiyeri (Universal Transport Medium: UTM) bulunan bir adet tüp içeren viral transport kiti (Copan Diagnostics, Brescia, İtalya) ile alınan nazofarenks sürüntü örnekleri hemen laboratuvara taşındı. Örnekler önce 30 sn vorteksenerek eküvyonun içindeki örnek materyalinin besiyerine geçmesi sağlandı ve eküvyon atıldı. Beklemeden direkt floresan antikor için yayma hazırlandı. Daha sonra 24 saat içinde hücre kültürüne ekim yapılacak örnekler 4°C'de, daha sonra ekim yapılacak örnekler çalışma zamanına kadar -70°C'de saklandı.

3.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü için adenovirusların üretilmesine uygun bir hücre hattı olan A549 (tip II akciğer epitelyal hücre) kullanıldı. Hücrelerin idamesi için %10 Fetal bovine serum (Sigma F7524), %2 L-glutamin (Sigma G7513), %1 HEPES (Sigma H0887),

%1 penisilin-streptomisin (Sigma P0781), %0.1 gentamisin (Sigma G1272) ve %0.4 amfoterisin-B (Sigma A2942) solüsyonu içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D-6546) besiyeri hazırlandı. Tek tabaka oluşturarak flaskı kaplayan hücre hattı 4-7 günde bir tripsin/EDTA (Sigma 59429C) ile 1/5-1/10 oranında pasajlanarak çalışma süresince hücrelerin idamesi sağlandı. Hasta örneklerinin ekileceği shell-viallerin hazırlanması için flaskı kaplayan tek tabaka hücre hattının üzerindeki besiyeri steril bir pipet yardımıyla alındıktan sonra hücre tabakası 2-3 ml tripsin/EDTA ile yıkandı. Tekrar (kullanılan flaskın büyüklüğüne göre) 1-2 ml tripsin/EDTA ilave edildi ve 37°C'de yaklaşık 5 dakika bekletilerek hücrelerin ayrışması sağlandı. İki-üç ml besiyeri ilave edilerek nazikçe pipetaj yapıldı ve hücrelerin yoğunluğu ayarlanarak (ml'de $1-2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde) içerisine lamel konularak steril edilmiş (180°C'de 2 saat) shell viallere 1'er ml hücre süspansiyonu dağıtıldı. Viallerin üzeri kapatılarak 24 saat süresince 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi. Ertesi gün hücreler viallerin içindeki lamelin yüzeyini %80-90 oranında kapladığı mikroskopla doğrulandıktan sonra vialin içindeki besiyeri steril bir pipet yardımıyla alındı ve hücreler bir kez besiyeri ile yıkandı. Hasta örnekleri 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra her örnekten 3'er adet olmak üzere 300 µl örnek vialle inoküle edildi ve vialler 700 g'de oda ısısında 1 saat santrifüj edildikten sonra 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda 1 saat virusun hücreye adsorbe olabilmesi için bekletildi. Her bir vialle 1,5 ml 37°C'ye getirilmiş besiyeri ilave edildi. Vialler üzeri kapatılarak farklı sürelerde (her örnekten biri 3, biri 4 ve biri 5 gün olmak üzere) 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi. Sürenin sonunda viallerden besiyeri alındı ve her lamel 1 kez 1 ml PBS ile yıkandı. Kuruyan lamellerin üzerine 2 ml aseton konarak -20°C'de 10 dakika bekletildi. Aseton bir pipet yardımı ile tamamen alınıp lamellerin kuruması beklendi. Lameller Adenovirus DFA Kit (Light Diagnostics, MILLIPORE, ABD & Kanada) ile boyandı. Daha sonra floresan mikroskopta önce x20 büyütmede taranan lameller şüpheli alanlar görüldüğünde x40 büyütmede değerlendirildi. Adenovirus ile enfekte hücreler nükleer ve/veya stoplazmik floresan verebilir ve hücre kültürlerinde enfekte hücreler yuvarlaklaşmış üzüm salkımı şeklinde gruplar oluşturabilirler. Nükleer boyanma düzgün parlak, stoplazmik boyanma ise noktalıdır. En az 2 veya daha fazla sayıda hücrenin bu şekilde tipik floresan verdiği yaymalar pozitif olarak kabul edildi. Yaymalar değerlendirilirken kullanılan kitin içerisinden çıkan pozitif ve negatif

kontrol yaymaları da dikkate alındı. Örnek ekimi sonrasında kontaminasyon görülen örneklerin ekimi örnekler 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ekilerek tekrarlandı.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hasta örneklerinden adenovirus DNA varlığının araştırılması amacıyla PZR işlemi tüm örneklerde DNA ekstraksiyonu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagene, Almanya) ile 400 µl örnek ile başlanıp 60 µl eluat elde edilerek gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ise LightMix Kit human Adenovirus (TIB MOLBIOL, Almanya) kiti ile Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı üzerinde gerçekleştirildi. LightMix human Adenovirus (TIB MOLBIOL, Almanya) kiti hexon geni üzerindeki 129 bp uzunluğundaki bir gen bölgesini hedef alan primerler kullanmakta; PZR inhibitörü varlığının araştırılması için de kit içinde 278 bp uzunluğunda internal kontrol yer almaktadır ve 690 kırmızı işaretli prob 705 kanalında tespit edilir. Analiz aşamasında renk düzeltme (color compensation) işlemi LightCycler Multicolor Demo Set (Roche Diagnostics) kiti ile yapıldı. Kitin alt saptama limiti 100, kantitasyon aralığı ise 100-1.000.000 kopya/ml idi. Kit kantitasyon için 10 ile 1.000.000 kopya arasında 6 farklı standart içermekteydi. Her bir reaksiyon için kullanılan amplifikasyon karışımı ise: 3.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg^{+2} solüsyonu, 4 µl reagent mix (özümlü primer-prob karışımı), 4 µl internal kontrol karışımı, 2 µl Roche master (enzim) ve 5 µl örnek ekstraktı olmak üzere toplam 20 µl olarak hazırlandı ve kapiller tüplere konuldu. Hazırlanan kapillerler 1000 rpm de 1 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417 C, ABD) edildi ve amplifikasyon için Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics,) cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon protokolü 95°C 10:00 dk (1 siklus), 95°C 00:05 sn, 62°C 00:05 sn, 72°C 00:15 sn (50 siklus) ve erime eğrisi (melting curve) (1 siklus) olarak uygulandı. Amplifikasyon görülen örneklerde spesifikliğin kontrolü ürünlerin erime eğrisi analizi ile kontrol edildi.

3.5. Direkt Floresan Antikor Testi

4°C ısıda 400 x g hızla 10 dakika santrifüj edilen örneklerin dibe çöken kısmından 80 µl alınarak 800 rpm hızda 3 dakika sitosantrifüj (Thermo Electron Corporation Cytospin 4, ABD) işlemi uygulandı ve direkt floresan antikor testi için

yayma hazırlandı. Hazırlanan yaymalar havada kuruduktan sonra hücrelerin fiksasyonu için soğuk aseton ile üzeri kaplanarak 10 dakika -20°C’de bekletildi. Tekrar havada kurutulan yaymalar Adenovirus DFA Kit’i (Light Diagnostics, MILLIPORE, ABD & Kanada) ile boyandı. Bu amaçla üzeri bir damla (30-40 µl) Adenovirus/FITC antikorla kaplanarak nemli ortamda 37°C’de 30 dakika bekletilen yaymaların üzerindeki Adenovirus/fluorescein isothiocyanate (FITC) antikor solüsyonu fosfat tampon solüsyonu (phosphate buffered saline: PBS) ile akıtıldı ve lamalar PBS dolu bir şalenin içinde 5-10 dakika arada bir hafifçe çalkalanarak bekletildi. Lamlar üzerindeki fazla PBS bir kurutma kağıdı yardımı ile (hücre spotu korunarak) alınarak hücre spotu kurumadan üzerine mounting medium damlatıldı ve bir lamelle kapatıldı. Hücre miktarının yeterli sayıda olduğu yaymalar floresan mikroskopta x20 büyütmede tarandı, şüpheli alanlar x40 büyütmede değerlendirildi. En az 2 veya daha fazla sayıda intakt hücrenin adenovirus için tipik floresan verdiği yaymalar pozitif olarak değerlendirildi. Enfeksiyon göstergesi olarak hücrelerde düzgün parlak nükleer ve/veya noktalı stoplazmik floresan varlığı araştırıldı. Yaymalar değerlendirilirken kullanılan kitin içerisinden çıkan pozitif ve negatif kontrol yaymaları da dikkate alındı.

3.6. İstatistiksel Çalışma

İstatistiksel veri analizi için SPSS 18,0 programı kullanıldı. Veriler arasında karşılaştırma yaparken Mann-Whitney U, Pearson Chi-Square ve Fisher’s Exact testlerinden yararlanıldı. *p* değeri <0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 206 hastanın 113'ü (%54.9) erkek, 93 (%45.1)'ü kadındı. Hastaların %51.9'u 1 yaş ve altında, %74.8'i ise 2 yaş ve altındaydı (median değer 12 ay, aralık: 0.4-60). Çoğunluğu bronşit-bronşiolit (n=156,%75.7), daha az kısmı pnömoni (n=50, %24.3) tanısı almıştı. Yine bir çoğu (%63,3) poliklinik hastası iken %35.9'u yatan hastaydı. Örneklerin %89.3'ü Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınmıştı, %38'inde eşlik eden kronik bir hastalık tanısı (kromazomal anomali: down send, pompe; konjenital kalp hastalığı: ASD, VSD; kalp yetmezliği, astım, kistik fibrozis, lösemi, böbrek yetmezliği ve prematürite) vardı. Adenovirus pozitif çocuklarda kronik hastalık tanısı olması sıklığı (kromazomal anomali + konjenital kalp hastalığı: n=1, konjenital kalp hastalığı: n=2, metabolik hastalık + koanal atrezi: n=1, çölyak hastalığı: n=1 ve atopik dermatit: n=1) (%50) adenovirus negatif çocuklardan (%37.6) daha fazla olmasına rağmen arada anlamlı bir fark yoktu ($p=0.5$). Örnek alındığı sırada hastaların %37.9'u antibiyotik tedavisi almaktaydı (Tablo 4.1). İkiyüz altı hastanın 12'sinde (%5.8) en az bir yöntemle adenovirus saptandı.

Adenovirus pozitif hastaların demografik özellikleri incelendiğinde ortalama yaş 18,5 ay (median: 18, aralık 1,5 - 48), 4'ü kadın (%33.3) 8'i erkekdi (%66.7). Örneklerin 10'u (%75) pediatri polikliniğinden (9'u acil, 1'i normal poliklinik), 2'si (%25) pediatri servisi yatan hastalarından alınmıştı. Onbir hasta bronşit-bronşiolit (%91.7), 1 hasta (%8.3) pnömoni tanısı almıştı. Hastaların 10'unun klinik şikayetleri başlayalı 1-3 gün olmuştu, 4'ü örnek alındığında antibiyotik kullanmaktaydı. Örneklerin %85.3'ü Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınmıştı. Pozitif çıkan örneklerin %75'de Nisan ayına aitti (Tablo 4.1 ve 4.2.).

Tablo 4.1. Adenovirus pozitif ve negatif hastaların klinik bulgularının karşılaştırılması.

Özellikler	Toplam (%)	Adenovirus negatif (%) (n=194)	Adenovirus pozitif (%) (n=12)	p
Demografik özellikler				
Yaş (ay): median, (aralık)		12 (0.4-60)	18 (1- 48)	0.6
Erkek	113 (54.9)	105 (54.1)	8 (66.8)	0.3
Kadın	93 (45.1)	89 (45.9)	4 (33.4)	0.3
Eşlik eden klinik tanı varlığı	79 (38)	73 (37.6)	6(50)	0.5
Örneğin alındığı birim				
Pediyatri acil polikliniği	125 (60)	116 (59.8)	9 (75)	
Pediyatri polikliniği	7 (3.4)	6 (3.1)	1 (8.3)	
Pediyatri servisi (yatan hasta)	59 (28.6)	57 (29.4)	2 (16.7)	
Yoğun bakım	15 (7.3)	15 (12)	0 (0)	
Örnek alındığı sırada antibiyotik tedavisi alan hasta sayısı	78 (37.9)	74 (38.1)	4 (33.3)	1
Klinik Tanı				
Bronşit-Bronşiolit	156 (75.7)	145 (74.7)	11(91.7)	0.3
Pnömoni	50 (24.3)	49 (25.3)	1(8.3)	0.3
Muayene bulguları				
Öksürük	169 (82)	157 (80.9)	12 (100)	0.1
Farenjit	123 (59.7)	113 (58.2)	10 (83.3)	0.1
Tonsillit	39 (18.9)	34 (17.5)	5 (51.7)	0.05
Konjonktivit	8 (3.9)	7 (3.6)	1 (8.3)	
İshal	20 (9.7)	17 (8.8)	3 (25)	0.9
Otit	16 (7.7)	15 (7.7)	1 (8.3)	
Ateş (>37°C)	105 (51)	99 (51)	6 (50)	0.9
Median (aralık) °C		37.2 (36-40)	37.2 (36-39)	0.7
Taşıpne	87 (42.2)	81 (41.8)	6 (50)	0.5
Hırıltılı solunum	78 (37.9)	72 (37.1)	6 (50)	
Solunum sıkıntısı	50 (24.3)	45 (23.2)	5 (41.7)	0.1
Patolojik solunum sesi varlığı	112 (59.2)	114 (58.8)	8 (66.7)	0.7

Tablo 4.2. Adenovirus pozitif örneklerde test sonuçlarının karşılaştırılması.

Örneğin alındığı tarih	Cinsiyet	Yaş (ay)	DNA kopya sayısı	DFA	Kültürde üreme (kaçıncı gün)	Tanı	Eşlik eden hastalık
26.10.11	E	18	<100	-	Üremedi	Bronşit-bronşiolit	Çölyak
20.12.11	E	2	15200	Yapılmadı	Üremedi	Bronşit-bronşiolit	Yok
09.02.12	K	18	<100	-	Üremedi	Pnömoni	Down Sendromu Konjenital Kalp hast
05.03.12	K	9	<100	+	4. gün	Bronşit-bronşiolit	Koanal atrezi, metabolik hastalık
07.03.12	K	18	787	-	Üremedi	Bronşit-bronşiolit	Yok
10.03.12	E	16	<100	-	5. gün	Bronşit-bronşiolit	Yok
13.03.12	E	9	<100	-	Üremedi	Bronşit-bronşiolit	Yok
14.03.12	K	18	>1000 000	+	3.gün	Bronşit-bronşiolit	Atopik dermatit
14.03.12	E	1	<100	-	3. gün	Bronşit-bronşiolit	ASD
16.03.12	E	18	<100	-	5. gün	Bronşit-bronşiolit	Yok
20.03.12	E	48	8880	+	4.gün	Bronşit-bronşiolit	Kalp yetmezliği
25.03.12	E	48	<100	+	5. gün	Bronşit-bronşiolit	Yok

Pozitif hücre görülmedi : (-), tipik floresan veren en az 3-4 hücre görüldü:(+).

Çalışmaya alınan 206 örneğin 7'si (%3.4) hücre kültürü ve PZR ile pozitifken 194'ü (%94.2) her ikisi ile de negatifti. Örneklerin 12'sinde (%5,82) PZR ile, 7'sinde (%3,39) hücre kültürü ile adenovirus saptandı.

PZR ile pozitif bulunan 5 örnek hücre kültüründe üremedi. Adenovirus DFA testi uygulanan 153 örneğin 12'si hücre miktarı yetersiz olduğundan değerlendirilemezken, 141 örneğin 4'ü (%2.8) her üç yöntemle de pozitif bulundu. DFA testiyle pozitif bulunan 6 örnek PZR ve hücre kültürü ile negatif bulundu. PZR ve hücre kültürü testleri tekrarlandı, ancak pozitiflik saptanmadı ve yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi.

Hücre kültürüyle kıyaslandığında PZR testinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD'leri sırasıyla %100, %97.5, %58.3, %100; DFA testinin %57, %95.5, %40, %97.7 olarak belirlendi (Tablo 4.3. ve 4.4). PZR testi ile karşılaştırıldığında 3 günlük inkübasyon sonrasında hücre kültürün duyarlılığı çok düşükken (%16.6), 5 günlük inkübasyon sonrasında duyarlılık %58.3'e yükseldi (Tablo 4.5).

Tablo 4.3. PZR testinin hücre kültürüyle karşılaştırılması.

PZR	Kültür			
		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	7	5	12
	Negatif	0	194	194
	Toplam	7	199	206

Duyarlılık %100, Özgüllük %97.5, PPD%58.3, NPD%100

Tablo 4.4. DFA testinin hücre kültürüyle karşılaştırılması.

DFA	Kültür			
		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	4	6	10
	Negatif	3	128	131
	Toplam	7	134	141

Duyarlılık %57, Özgüllük %95.5, PPD%40, NPD%97.7

Tablo 4.5. Hücre kültürünün PZR ile karşılaştırılması.

Kültür	PZR			
		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	7	0	7
	Negatif	5	194	199
	Toplam	12	194	206

Duyarlılık %58.3, Özgüllük %100, PPD%100, NPD%97.5

Başvuru anındaki yakınmalarına ve muayene bulgularına bakıldığında öksürük (%82), farenjit (%59.7), patolojik solunum sesi varlığı (%59.2) (ral, ronküs, wheezing, uzamış ekspiryum) ve ateş yüksekliği (%51), taşipne (%42.2), hırıltı (%37.9), respiratuvar distres (%24.3), tonsillit (%18.9), ishal (%9.7), otit (%7.7) ve konjonktivit (%3.7) olarak bulundu. Alt solunum yolu enfeksiyonuna ek olarak tonsillit görülen hasta sayısı adenovirus pozitif hasta grubunda (%51.7) negatif olan gruba (%17.5) kıyasla nisbeten fazla olmakla birlikte, her iki grup arasında istatistiksel olarak sınırda bir fark vardı ($p=0.05$) (Tablo 4.1).

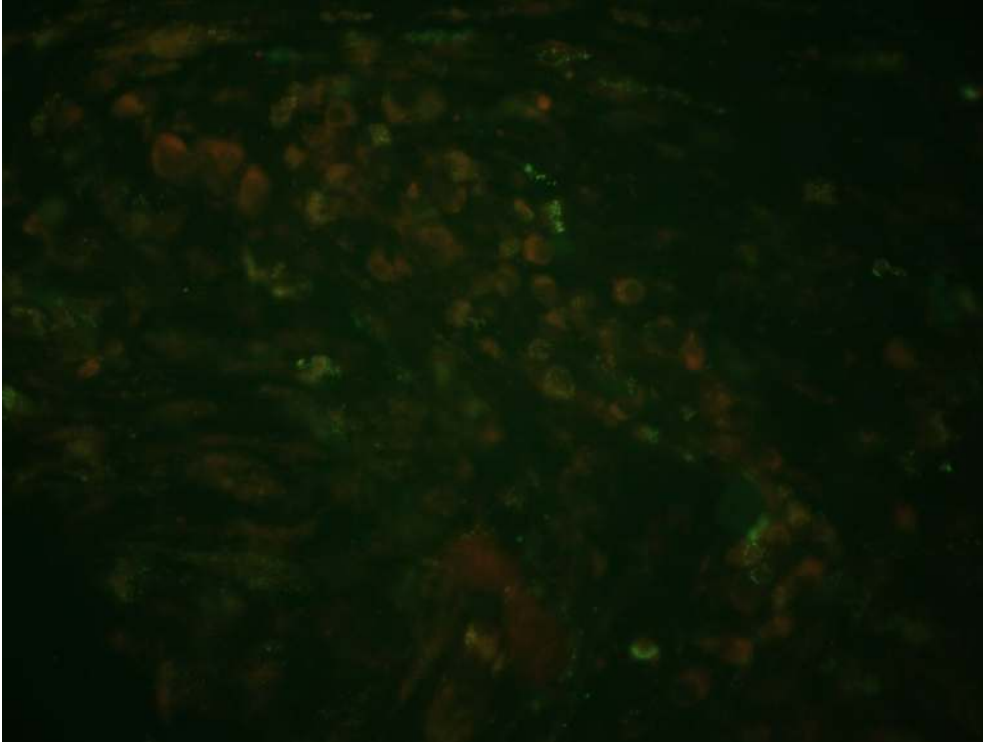
Laboratuvar bulgularına bakıldığında adenovirus pozitif olan grupta (%63.3) ve negatif olan grupta (%85.7) oranında CRP yüksekliğine ve adenovirus pozitif olan grupta (%60.2) ve negatif olan grupta (%62.5) artmış lenfosit miktarına olmak üzere daha sık rastlandı. Akciğer grafisi çekilen hastalara bakıldığında (n=122) patolojik bulgu (fokal konsolidasyon, dansite artışı, bronkovasküler dallarda belirginleşme vb.) görülme oranı adenovirus pozitif hastalarda daha azdı (%14.3), ancak aradaki fark

istatistiksel olarak sınır değerdeydi ($p=0.05$). Diğer tüm bulgular karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Aynı şekilde her iki gruba uygulanan tedavi ajanları da benzerdi (Tablo 4.6.).

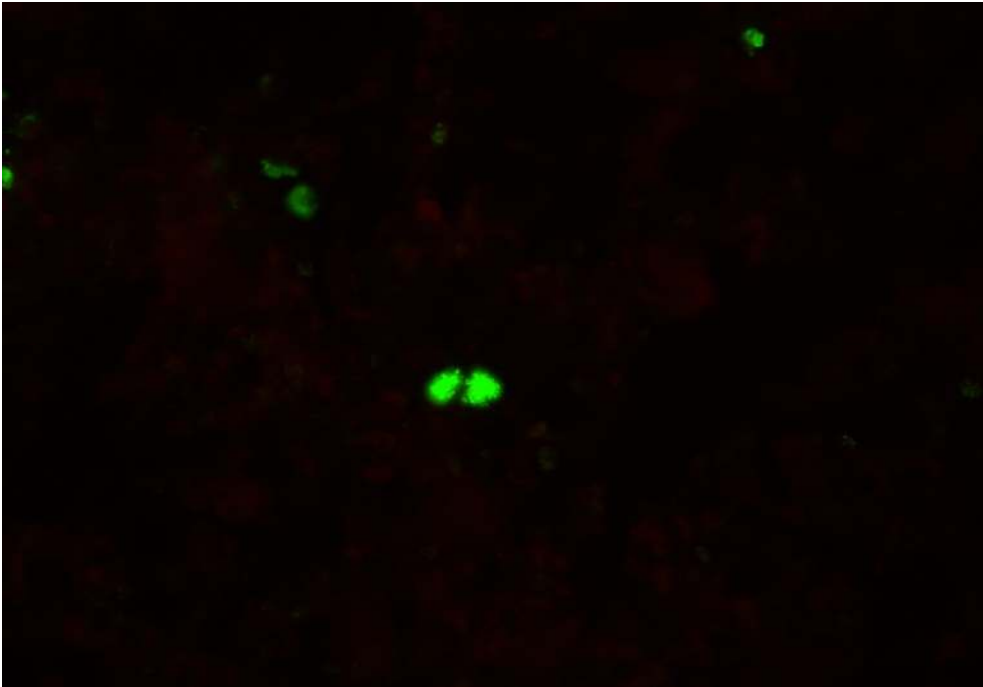
Hastalar tedaviye yanıtları ve prognozları açısından değerlendirilmedi.

Tablo 4.6. Adenovirus negatif ve pozitif hastaların radyoloji, laboratuvar ve uygulanan tedavi verilerinin karşılaştırılması.

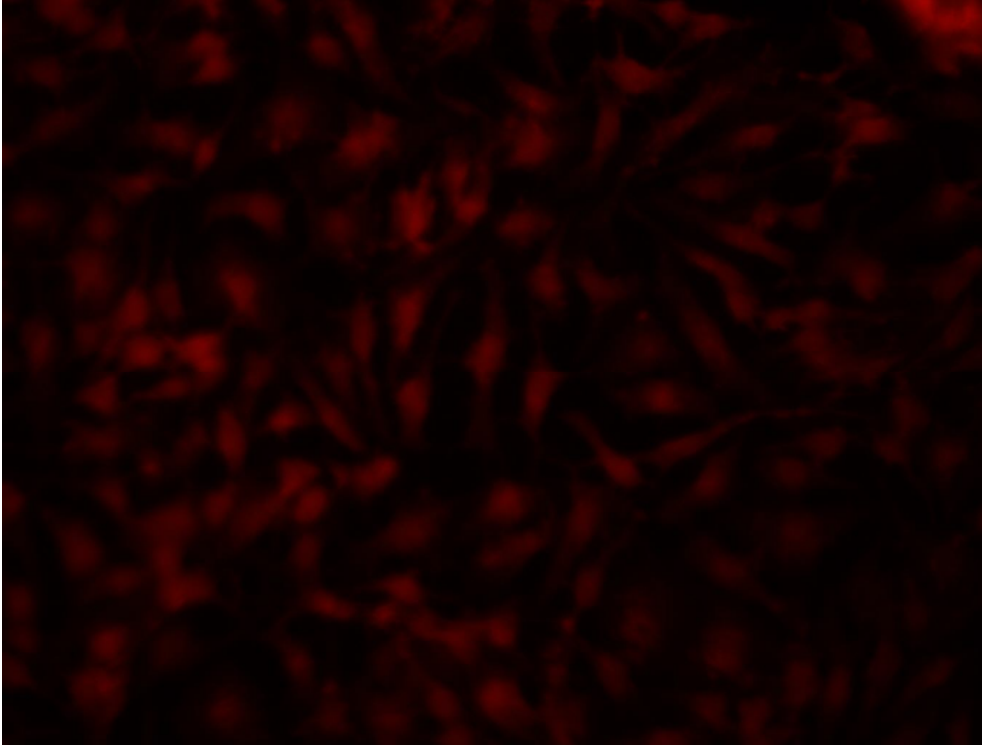
Özellikler (n=testin uygulandığı hasta sayısı)	Toplam (%)	Adenovirus negatif (%) (n=194)	Adenovirus pozitif (%) (n=12)	p
Akciğer grafisi (n=122)		115	7	
Patolojik görünüm var	65 (53.2)	64 (55.6)	1 (14.3)	0.05
Doğal	57 (46.7)	51 (44.3)	6 (85.7)	
CRP miktarı (n=116)		109	7	
Yüksek	75 (64.7)	69 (63.3)	6 (85.7)	0.4
Median (aralık) (mg/dl)		0.78 (0.01-26)	1.4 (0.02-11.2)	2.1
Lökosit (n=121)		113	8	
Median (aralık) (bin/mm ³)		11.0 (14.5-38.4)	11,79 (6.8-14.7)	0.9
Yüksek	64 (52.9)	59 (52.2)	5 (62.5)	
Düşük	5 (4.4)	5 (4.1)	0	
Nötrofil miktarı (n=121)		113	8	
Median (aralık) (bin/mm ³)		4.13 (7.8-29.0)	5.31(0.94-8.65)	0.7
Yüksek	27 (22.3)	23 (20.3)	3 (37.5)	
Düşük	15 (12.4)	13 (11.5)	2 (25)	
Lenfosit miktarı test edilen (n=121)		113	8	
Median (aralık) (bin/mm ³)		4.02 (0.35-1.8)	4.23(1.09-8.4)	0.7
Yüksek	73 (60.3)	68 (60.2)	5 (62.5)	
Düşük	9(7.4)	8 (7.1)	1 (12.5)	
Trombosit miktarı test edilen (n=121)		113	8	
Median (aralık) (bin/mm ³)		346.0 (25.0-891.0)	356.5 (285.0-582.0)	0.3
Yüksek	37 (30.6)	34 (30)	3 (37)	
Düşük	9 (7.4)	9 (8)	0	
Tedavi				
Antibiyotik tedavisi (n=206)	112 (54.4)	107 (55.2)	5 (41.5)	0.3
Bronkodilatatör kullanımı	80 (38.8)	75 (38.7)	5 (41.7)	0.1
İnhaler beta-2 adrenerjik agonist kullanımı	166 (80.6)	156 (80.4)	10 (83.3)	1
İnhaler Steroid kullanımı	79 (38.3)	73 (37.6)	6 (50)	0.5
Sistemik Steroid kullanımı	18 (8.7)	16 (8.2)	2 (16.7)	0.2



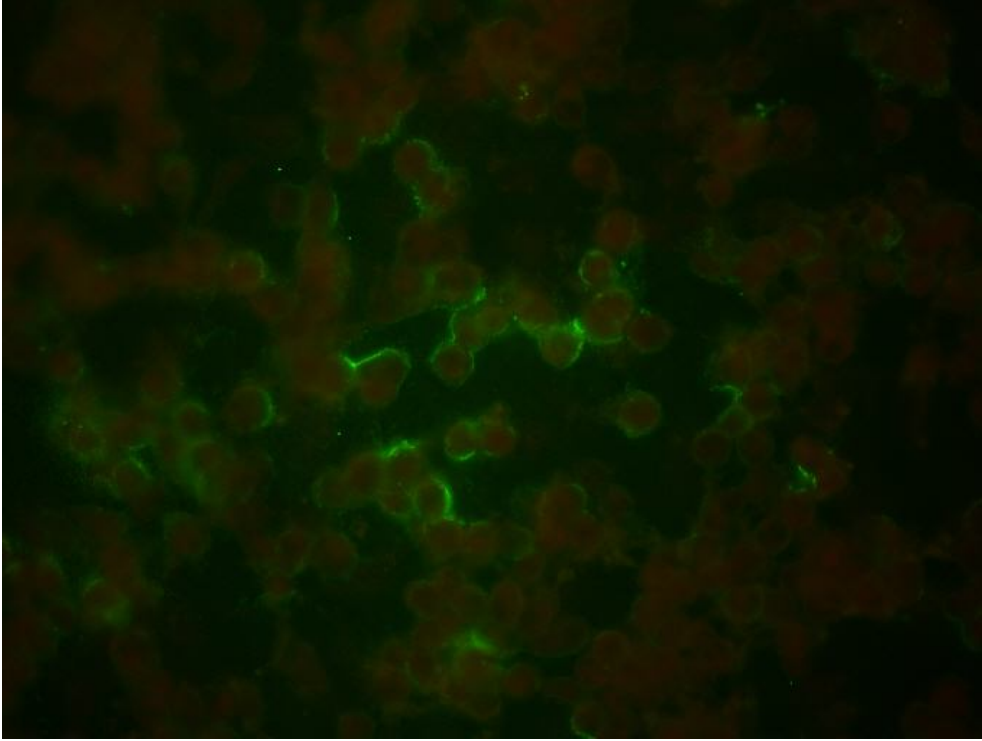
Resim 4.1. Adenovirus pozitif DFA yayması (x20'lik büyütme).



Resim 4.2. Adenovirus pozitif DFA yayması (x40'lik büyütme).



Resim 4.3. Ekim yapılmamış A549 hücreleri (x40'lık büyütme).



Resim 4.4. Adenovirus üremiş ve FITC ile işaretli monoklonal antikorla boyanmış A549 hücresi (x40'lık büyütme).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada çocuk yaş grubunda alt solunum yolu enfeksiyonlarında adenovirusların görülme sıklığı %5.8 olarak bulunmuş ve özellikle bronşit-bronşiolit tablolarından sorumlu oldukları saptanmıştır.

Adenoviruslar sıklıkla solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve göz tutulumu ile seyreden enfeksiyonlar şeklinde karşımıza çıkan geniş spektrumlu hastalık etkenidirler (44). Alt solunum yolu enfeksiyonlarının %5-10'undan adenoviruslar (özellikle serotip 1, 3, 5, 7 ve 21) sorumlu tutulmaktadır (45,46).

Alt solunum yolu enfeksiyonları çocukluk çağında oldukça sıktır. Bronş ve bronşiollerin inflamasyonu ve/veya akciğer parankiminin inflamasyonu olarak karşımıza çıkan klinik tablolar birbirini izleyebildiği gibi birlikte de görülebilirler. Çocukluk çağında bu enfeksiyonların en sık sebebi viruslardır. Adenovirusların neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları erken yaşlarda daha sık görülür ve genellikle iyi seyirlidir. Bu yüzden virusun izolasyonu bir çok tanı laboratuvarında yapılmaz. Ancak erken yaşlarda geçirilen (özellikle 2 yaşından önce) ve/veya tekrarlayan akciğer parankim enfeksiyonları gelişimi henüz tamamlanmamış olduğundan doku hasarına zemin hazırlayarak, enfeksiyon sonrası bronşiolitis obliterans (%47 oranında) gibi ciddi obstruktif akciğer hastalıklarına yol açabilir (47,48).

Bronşiolitis obliterans, çocukluk çağında geçirilen viral alt solunum yolu enfeksiyonlarının en önemli geç komplikasyonudur. Özellikle adenovirusların etken olduğu bazı hastalarda, süregen inflamasyon nedeniyle bronş duvarında geri dönüşümsüz değişiklikler meydana gelmektedir. Dolayısıyla viral etyolojisinin belirlenmesi, prognoz tahmin edilmesi ve izlemin planlanmasına yardımcı olabilir.

Bu çalışmada adenovirus pozitifliği saptanan hastaların %51.9'u 1 yaş ve altında, %74.8'i ise 2 yaş ve altında bulunmuştur (median, aralık: 18, 1 – 48 ay). Adenovirus negatif olan hastalarda da yaş ortalaması düşüktür (median, aralık: 12, 0.4 – 60 ay) ve her iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.6$).

Hastaların eşlik eden kronik hastalıklarının varlığı solunum sistemi enfeksiyonlarının sıklığını ve ciddiyetini arttırmaktadır. Ancak çalışmamızda eşlik eden kronik hastalıkların adenovirus enfeksiyonları ile ilişkisi saptanmamıştır ($p=0.5$).

Viral kültür solunum yolu viruslarının tanısında altın standarttır. Ancak yöntemin başarısı için uygun hasta ve örnek seçimi, örnek miktarının yeterli olması, örneğin uygun koşullarda alınarak laboratuvara taşınması ve çalışılması çok önemlidir (44). Alt solunum yolu enfeksiyonlarında viral etkenlerin tanımlanmasında nazofarenks aspirasyonu, orofarenks ve/veya nazofarenks sürüntüsü, nazofarenks yıkama solüsyonu, trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj, balgam ve akciğer biyopsisi gibi örnekler kullanılabilir (44,49). İnvaziv bir işlem gerektiren yöntemler (bronkoalveolar lavaj ve akciğer biyopsisi gibi) rutin kullanımda pek tercih edilmezler. Yapılan çalışmalarda nazofarenks yıkama solüsyonunun nazofarenks ve orofarenks sürüntüsüne göre daha iyi virus izolasyonu sağladığı görülmüştür. Ancak bu işlemin de her hastaya uygulanması zahmetlidir (49). Hücre kültürü yapılacaksa viruslar için toksik madde içermeyen eküvyonlar (dakron veya polyester), özellikle hasta toleransını kolaylaştırdığı için esnek saplı eküvyonlar bu alanda yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan esnek flocced eküvyonların örneğin alınması sırasında çocuklarda hasta uyumunu kolaylaştırdığı görülmüştür. Ancak çalışmanın başlangıcında alınmış olan 12 (%5.8) örnekten hazırlanmış yaymalarda hücre miktarının yetersiz olduğu görüldüğünden, bu yaymalar DFA ile değerlendirilememiştir. Bu yüzden birçok mikrobiyolojik çalışmada ilk basamak olan örnek alma işleminin de tecrübeli ve hastayı doğru yönlendirebilen kişiler tarafından yapılması önemlidir. PZR ile adenovirus pozitifliği görülen 8 örnekte viral yük oldukça düşüktür (<100 kopya/ml). Bu örneklerden 4'ünde hücre kültüründe geç üreme görülmüştür (4. ve 5. günlerde). Solunum yolu enfeksiyonlarında nazofarengeal yıkama sıvısının alınması önerilmekle birlikte, bu yöntem tecrübe gerektirmektedir ve özellikle küçük çocuklarda oldukça zahmetlidir. Flocced eküvyonlar ise çok kolay uygulanabilirler ve bu nedenle tercih edilmektedirler. Virus izolasyonunda örnek alımında bir çalışmada flocced eküvyon kullanımının adenovirus izolasyon oranını azalttığı bildirilmekle beraber (C.DeByle ve ark. 2012), flocced eküvyon kullanımının saptama oranını anlamlı etkilemediğine işaret eden yayınlar da vardır (50,51,52).

Çalışmamızda alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda adenovirus enfeksiyon oranı %5.8 oranında bulunmuştur. Örnek alımında farklı yöntemler denenmediği için flocced eküvyonun saptama oranına etkisi hakkında bir şey söyleyemiyoruz.

Shell vial yöntemi ile viral izolasyon klasik hücre kültüründeki gibi sitopatik etkinin oluşması beklenmediği için daha erken tanı sağlamakta, üstelik floresan işaretli monoklonal antikorların kullanılması virusun tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak klasik hücre kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılığı daha düşük kalmaktadır. İnkübasyon süresi uzatıldığında duyarlılığının yüksek olduğunu bulan çalışmalar vardır. Rabalais ve ark. adenovirus için klasik hücre kültürü yöntemi ile (ortalama 7.6 günlük inkübasyon sonrası) shell vial yöntemini (2 günlük inkübasyon sonrası) karşılaştırdıklarında, shell vial yönteminin duyarlılığını %83 bulmuşlardır (53). Mahafzah ve ark. ise A549 hücrelerini Adenoviruslar için en duyarlı hücre dizisi olarak tanımlamış ve santrifügasyon yönteminin duyarlılığını klasik hücre kültürü ile karşılaştırdıklarında 2 günlük inkübasyon sonrası %77; 5 günlük inkübasyon sonrası ise %100 olduğunu bildirmişlerdir (54). Bu çalışmada tüm örneklerde hücre kültürü shell vial yöntemi ile uygulanmıştır. PZR ile karşılaştırıldığında 3, 4 ve 5 günlük inkübasyonlar sonrası hücre kültürünün duyarlılığı giderek artmıştır (%16.6, %33.3 ve %58.3) ve 5 günlük inkübasyonun duyarlılığı daha yüksektir. Bu durum örnekteki virus miktarı ile de ilişkili olabilir. En yüksek viral yüke sahip örnek (>1000000 kopya/ml) 3. günde üremiş ve DFA'sı da pozitif olarak değerlendirilmiştir. İkinci yüksek viral yüke sahip olan örnek (15200 kopya/ml) kültürde ürememiş, bunun örneğin saklanması sırasında virusların canlılığını kaybetmesi nedeniyle olduğu düşünülmüştür (bu örneğe DFA testi de uygulanmamıştır). Enomoto ark'ları çalışmalarında 100 kopya/ml adenovirus DNA içeren örneklerde 21 günlük inkübasyon sonrası kültür pozitifliğini %60 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda bu oran (5 günlük inkübasyon sonrası) %62.5 olup, bu çalışmayla kıyaslandığında yaklaşık olarak aynı değerdedir (22). Ayrıca PZR için başlangıç hacmi 400 µl iken, hücre kültürüne 300 µl hacimle ekim yapılmış bu da %25 oranında bir kayba yol açmıştır. Pehler-Harrington ve ark'ları çalışmalarında kullandıkları PZR yöntemini klasik hücre kültürüyle kıyaslamış, duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulmuşlardır (29).

Solunum yolu viruslarının tanısında kültür altın standart olarak kabul edilse bile PZR testlerindeki gelişmelerle bu testler tanıda tercih edilir olmuştur. Özellikle örneklerin saklanması ve çalışılmasının daha kolay olması, çok miktarda örneğin çalışılmasına olanak sağlamaları ve duyarlılıklarının diğer yöntemlere göre daha yüksek olması bu testleri avantajlı hale getirmektedir.

Viral antijenlerin direkt tanımlanması hızlı ve kolay bir yöntemdir. Ancak diğer solunum yolu viruslarının aksine adenoviruslar için duyarlılığı düşüktür (%50) (44). DFA testinin özgüllüğünün yüksek olduğu bilinmektedir. DFA testi PZR testi ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %36.4 ve %95.4, hücre kültürüyle karşılaştırıldığında %57 ve %95.5 olarak bulundu. Örneklerin içerdiği viral yük düşük olduğundan PZR ile kıyaslandığında duyarlılık düşüktü, hücre kültürü ile kıyaslandığında ise literatürle uyumlu bulundu (25). Bu çalışmada DFA ile 10 örneğin yaymasında pozitiflik saptanmış ancak bunların 6 tanesi diğer yöntemlerle doğrulanamamıştır. Kullanılan ticari DFA kitinin içeriğinde non spesifik perinükleer veya diffüz stoplazmik boyanmaların herpesviruslarla infekte hücrelere antikorların Fc reseptörleriyle bağlanması sonucu olabileceği belirtilmektedir (55). Bu nedenle bu 6 preparat yalancı negatif olarak değerlendirilmiştir. Yüksel ve ark.'ları 2008 yılında yayınlanan çalışmalarında alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda DFA yöntemi ile adenovirus sıklığını %7.94 olarak bulmuşlardır (56). Bu çalışmada bu oran %2.8'dir.

Ülkemizde solunum yolu enfeksiyonu etkenleri ile ilgili çalışmalar genellikle en sık etken olan RSV üzerinde yoğunlaşmış olup adenovirus ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Aslan ve ark.'ları 1997-1998 yılları arasında 45 üst solunum yolu enfeksiyonlu çocukta shell vial ve klasik kültür yöntemiyle adenovirus pozitifliğini %6 bulurlarken, 50 alt solunum yolu enfeksiyonlu çocukta shell vial yöntemiyle bu oranı %10 bulmuşlardır (57). Bodur ve ark.'ları 2007 yılında Ankara'da yaptıkları bir çalışmada solunum yolu enfeksiyonu şikayetleri olan ilköğretim çağı öğrencilerinden aldıkları boğaz sürüntü örneklerinde PZR yöntemi ile adenovirus pozitifliğini araştırmışlar ve %2.2 (11/500) oranında pozitiflik saptamışlardır (24). Çocuklardaki alt solunum yolu enfeksiyonlarının İsrail'de %2'sinde, Arjantin'de %14.3'ünde etkenin adenovirus olduğu belirtilmiştir (58,59). Katırcıoğlu ve ark.'ları kronik tonsilliti olan çocuklarda Adenovirus antikor pozitifliğini 12/22 oranında bulmuşlardır (60).

Çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonları daha çok bronşit-bronşiolit şeklinde karşımıza çıkmakta ve bu iki klinik tanı birbirinden zor ayrıldığı gibi birbirini takip de edebilmektedir. Bu yüzden hastalar gruplandırılırken bu iki klinik tanı birlikte değerlendirildi. Bronşit-bronşiolit tanısı alan 156 (%75.7) hastada adenovirus

pozitifliği %7.05 oranında (11/156) saptandı. Ricart ve ark.'ları bronşitli çocuklarda PZR yöntemiyle bu oranı benzer şekilde (%7.8) olarak bulmuşlardır (61).

Hastaların fizik muayenesinde (%82 ile %3.8 arasında giderek azalan sıklıkla) öksürük, farenjit, patolojik solunum sesi varlığı (wheezing, ronküs, ral, uzamış ekspiryum), ateş yüksekliği, taşipne, hırıltı, respiratuvar distres, tonsillit, ishal, otit ve konjonktivit gibi klinik bulguların olduğu görüldü. Yüksek ateş hariç diğerleri adenovirus pozitif hastalarda daha fazla görülmekle birlikte aradaki bu fark hiçbir değişkende anlamlı düzeyde değildi ($p>0.5$). Sadece tonsillit adenovirus pozitif hastalarda istatistiksel olarak sınır değerde daha yüksekti ($p=0.05$). Videla C ve ark.'ları RSV ve adenovirus etkenli alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocukları karşılaştırmışlar ve klinik bulgular arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (62).

Akciğer grafisi çekilen hastalarda adenovirus negatif olan grupta daha yüksek oranda patolojik bulguya rastlanmış, ancak adenovirus pozitif olan sadece 1 pnömoni tanılı hasta olduğundan bunun yorumlanması doğru bulunmamıştır. Laboratuvar bulgularında sırasıyla CRP (%64), lenfosit (%60.3), lökosit (%52.9), trombosit (%30) ve nötrofil yüksekliği (%22.3) görülmüş ancak hem bu değerlerin yüksek olup olmaması, hem de kantitatif olarak median değerleri -fizik muayene bulgularında olduğu gibi- adenovirus pozitif hastalarda daha yüksek oranda olmasına rağmen hiçbir değer için fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Frank ve ark.'ları çalışmalarında benzer şekilde adenoviruslara bağlı pnömonisi olan çocuklarda ve başka etkenlere bağlı pnömonili çocuklarda klinik bulguları karşılaştırdıkları çalışmalarında yaş, cinsiyet ve ateş süresi açısından fark bulamamış, ancak ekstra pulmoner bulguların (konjonktivit, ishal, lenfadenopati, CRP) adenovirus pozitif çocuklarda daha sık (yarıdan fazla) olduğunu belirtmişlerdir (63). Bu çalışmada da benzer şekilde ekstra pulmoner bulgular ve laboratuvar bulguları sayı değerleri olarak yüksek olmakla birlikte, aradaki fark anlamlı düzeyde bulunmamıştır. Alharbi ve ark.'ları adenovirus pozitif alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda yaş ortalamasını 11.1 ± 8.1 ay, kadın %35, yatan hasta %66, ateş %67, konjonktivit %7, otitis media %10, ishal %20 olarak bulmuş; tedavide %72 antibiyotik, %66 bronkodilatör %31 steroid kullanımı olduğunu belirtmişlerdir (64). Reina ve ark.'ları 1997 ve 2003 yılları arasında 15 yaşın altındaki çocuklardan aldıkları 5746 solunum yolu örneğinde shell vial hücre kültürü yöntemi ile %1.7 oranında adenovirus izole etmiş, bu hastalarda yaş ortalamasını 14 ay; klinik tanıları

%61 bronşiolit, %10 pnömoni olarak bulmuşlardır. Aralık ve Mart aylarında enfeksiyonun sık görüldüğünü, sadece 5 hastada ishal şikayeti olduğunu, hiçbirinde konjonktivit olmadığını belirtmişlerdir (65).

Adenovirus enfeksiyonları yılın her mevsiminde görülebilir ancak kış ve ilkbahar aylarında sıklığı artmaktadır. Bu çalışmada adenovirus pozitif örneklerin büyük bir kısmı (%83.3) Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınmıştır.

Küçük çocuklarda, immün düşkün hastalarda ve hastanın eşlik eden kronik bir tanısı varlığında adenovirusların neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları yüksek mortalite (%16-28) ile seyredebilir ve bu oran bazı serotiplerde daha yüksektir (63,66,67). Adenovirus enfeksiyonlarındaki klinik bulguların enfeksiyona neden olan tiplere göre değişebileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (68). Ancak bu çalışmada izole edilen adenovirus serotipleri araştırılmamıştır.

6. SONUÇLAR

1. Alt solunum yolu enfeksiyonu yakınmaları ile Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 206 çocuğun floxed eküvyonla alınan nazofarengial sürüntü örneğinde %5.8 oranında adenovirus izole edilmiştir.
2. Adenovirus izolasyonu ile klinik bulgular ve mevsimsel dağılım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.
3. Solunum yollarında adenovirus izolasyonunda en önemli basamak kaliteli ve yeterli miktarda örnek alınmasıdır.
4. Solunum yollarından adenovirus izolasyonunda hücre kültürleri altın standart olmakla birlikte örneğin yeterli miktarda hücre içermesi ve inokülasyon yapılana kadar uygun koşullarda saklanması en önemli basamaktır.
5. Nazofarengial sürüntü örneklerinden adenovirus saptanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olup aynı gün içinde sonuç verilebilen PZR yöntemi kullanılabilir. Ekstraksiyon aşamasında yeterli örnek alınıp alınmadığı kontrol edilmelidir.
6. Nazofarengial sürüntü örneklerinden adenovirus saptanmasında DFA yönteminin duyarlılığı düşüktür bununla birlikte bu yöntemle örneğin yeterli alınıp alınmadığı preparatın incelenmesi sırasında anlaşılabilmektedir.
7. Nazofarengial sürüntü örneği alınmasında floxed eküvyon çocuklarda kolaylıkla uygulanabilmektedir.

7. ÖZET

ÇOCUKLARDA GÖRÜLEN ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA ADENOVİRUSLARIN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Adenovirüsler sıklıkla solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve göz tutulumu ile seyreden enfeksiyonlar şeklinde karşımıza çıkan geniş spektrumlu hastalık etkenidirler. Alt solunum yolu enfeksiyonlarının %5-10'undan adenovirüsler sorumlu tutulmaktadır.

Bu çalışmada çocuk yaş grubunda alt solunum yolu enfeksiyonlarında adenovirüslerin görülme sıklığı hücre kültürü, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve direkt floresan antikor (DFA) yöntemleri ile araştırılmış ve pozitiflik oranı %5.8 olarak bulunmuştur. Adenovirüslerin özellikle bronşit-bronşiolit tablolarından sorumlu oldukları görülmüş ancak yaş, eşlik eden kronik hastalık, fizik muayene ve laboratuvar bulguları, radyolojik bulgular ve mevsimsel dağılım ile aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Hücre kültürü referans test olarak alındığında PZR ve DFA'nın duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) özellikleri sırası ile; %100, %97.5, %58.3, %100 ve %57, %95.5, %40, %97.7 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda adenovirüslerin etken olduğu bu çalışmada saptanmıştır. Adenovirüs enfeksiyonlarının tanısında altın standart hücre kültürü olmakla birlikte tanıda yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip PZR yöntemi kullanılabilir. DFA'nın düşük duyarlılığı kullanımını kısıtlamaktadır, bununla birlikte örnek kalitesinin bu yöntemle anlaşılabildiği akılda tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Adenovirüs, alt solunum yolu enfeksiyonları, hücre kültürü, polimeraz zincir reaksiyonu.

8. ABSTRACT

RESEARCH OF THE FREQUENCY OF CHILDREN'S LOWER RESPIRATORY TRACK INFECTIONS

Adenoviruses are wide spectrum illness agents those we often see as the infections keep in the respiratory system, gastrointestinal system and eyes. The adenoviruses are responsible for the 5-10% of the lower respiratory track infections.

In this study the frequency of adenoviruses appearance as lower respiratory track infection in children's age group is searched by the cell culture, polymerase chain reaction (PCR) and direct fluorescent antibodies staining (DFA) methods and the positivity ratio is found 5,8%. It is found that adenoviruses are especially responsible for bronchitis-bronchiolitis picture but a significant relationship is not determined between age, accompanying chronic disease, physical examination, laboratory findings, radiologic findings and seasonal distribution. If cell culture is taken as the reference test PCR and DFA's sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) characteristics are found 100%, 97.5%, 58.3%, 100% and 57%, 95.5%, 40%, 97.7% in order.

As a result in this study it is detected that adenoviruses are factors of the children's lower respiratory track infection. However the golden standard for adenoviruses infections diagnosis is the cell culture, PCR method can be used, which is highly sensitive and specific in diagnosis. DFA's low sensitivity restricts its application, however it should be kept in mind that the sample quality could be understood by this method.

Key words: Adenovirus, lower respiratory track infections, cell culture, polymerase chain reaction.

9. KAYNAKLAR

1. Robinson C, Echavarria M. Adenoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. Washington: ASM Press 2007; 1589-600.
2. Bozkaya E, Us AD. Viral solunum yolu enfeksiyonları. Us DA, Ergünay K. Moleküler Kinik ve Tanısal Viroloji, 1. Basım, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2012; 177-215.
3. Ruuskanen O, Meurman O, Akusjärvi G. Adenoviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. Clinical Virology, 2th ed. Washington: ASM Press 2002; 515-35.
4. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 704.
5. Lundstrom K, Boulikas T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. Technol Cancer Res Treat 2003; 2(5): 471-86.
6. Atkinson RL. Viruses as an etiology of obesity. Mayo Clin Proc 2007; 82(10): 1192-8.
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Adenoviridae>, 2012
8. <http://www.microbiologybytes.com/virology/Adenoviruses.html>
9. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. J Gen Virol 2000; 81(Pt 11): 2573-604.
10. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function, J Gen Virol 2009; 90 (Pt 1): 1-20.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 5th ed: Philadelphia; Elsevier Inc 2005; 533-9.
12. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri 2008; 1696-700.
13. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 1. Baskı Güneş Kitabevi Ankara 1999; 807-13.
14. Langley JM. Adenoviruses. Pediatr Rev 2005; 26: 244-9.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed, Philadelphia, Lippincott 1997; 1177-293.
16. Bozkaya E. Parainfluenza, Adeno, Korona ve Rinoviruslar. ANKEM Derg 2006; 20 (Ek 2): 248-53.

17. Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4): 1419-24.
18. Evelyn M, Sharon L, Ludwig J. Reemergence of adenovirus type 4 acute respiratory disease in military trainees: Report of an outbreak during a lapse in vaccination. *J Infect Dis* 1999; 179: 1531-3.
19. Bicer S, Sahin GT, Koncay B, Gemici H, Siraneci R, Ozturk NY, Sevetoglu E. Incidence assessment of rotavirus and adenovirus associated acute gastroenteritis cases in early childhood. *Infez Med* 2011; 19(2): 113-9.
20. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 3049-53.
21. Takiff HE, Straus SE, Garon CF. Propagation and in vitro studies of previously noncultivable enteric adenoviruses in 293 cell. *Lancet* ii: 1981; 832-4.
22. Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, Hanaoka N, Chikahira M, Tniguchi K. Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 338-41.
23. Woods GL, Young A. Use of A-549 cells in a clinical virology laboratory. *J Clin Microbiol* 1988; 26(5): 1026-8.
24. Bodur E, Yapar M, Şener K. Üst solunum yolu infeksiyonu yakınmaları olan ilköğretim çağı çocuklarında PZR 70 yöntemi kullanılarak adenovirüs araştırılması *Gülhane Tıp Dergisi* 2009; 51: 162-7.
25. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004; 113(1 Pt 1): e51-6.
26. Landry ML, Ferguson D. Simulfluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Mikrobiol* 2000; 38: 708-11.
27. Fujimoto T, Okafuji T, Okafuji T, Ito M, Nukuzuma S, Chikahira M, Nishio O. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5489-92.
28. Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, Yamanaka T, Kuniya Y, Takeuchi Y, et al. Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 2007-9.

29. Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 4072-6.
30. Echavarria MS, Ray SC, Ambinder R, Dumler JS, Charache P. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 686-9.
31. Leruez VM, Minard V, Lacaille F. Real time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 45-52.
32. Hammond GW, Hazelton PR, Chuang I, Klisko B. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J Clin Mikrobiol* 1981; 14: 210-21.
33. Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1120-31.
34. Kroes AC, Klerk EP, Lankester AC, Malipaard C, Brouwer CS, Claas EC et al. Sequential emergence of multiple adenovirus serotypes after pediatric stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2007; 38: 341-7.
35. Arav-Boger R, Echavarría M, Forman M, Charache P, and Persaud D. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 1097-100.
36. Howard DS, Phillips II GL, Reece DE, Munn RK, Henslee-Downey J, Pittard M et al. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1494-501.
37. Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, Milligan DW. Fulminant adenovirus hepatitis following unrelated bone marrow transplantation: failure of intravenous ribavirin therapy. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1209-11.
38. Hale GA, Heslop HE, Krance RA, Brenner MA, Jayawardene D, Srivastava DK, Patrick CC. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 277- 82.
39. Morfin F, Dupuis-Girod S, Frobert E, Mundweiler S, Carrington D, Sedlacek P, et al. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir Ther* 2005; 10: 225-9.

40. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, Matthes-Martin S, Einsele H, Bleakley M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 481–6.
41. van Tol MJ, EC Claas, B Heemskerk, LA Veltrop-Duits, CS de Brouwer, T van Vreeswijk, et al. Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(Suppl.1): 73–6.
42. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 2002; 100: 1619–27.
43. Chakrabarti S, Mulligan DW, Moss PA, and Mautner V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 873–85.
44. Kesson MA. Respiratory virus infections. *Ped Respr Rew* 2007; 8: 240-8.
45. Kim YJ, Hong JY, Lee HJ. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4594-9.
46. Palomino MA, Larranaga C, Villagra E, Camacho J, Avendano LF. Adenovirus and respiratory syncytial virusadenovirus mixed acute lower respiratory infections in Chilean infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 337-41.
47. Becroft DMO. Brochiolitis obliterans, bronchiolitis, and other sequelae of adenovirus type 21 infection in young children. *J Clin Pathol* 1971; 24: 72–81.
48. Castro-Rodriguez JA, Daszenies C, Garcia M, Meyer R, Gonzales R. Adenovirus pneumonia in infants and factors for developing bronchiolitis obliterans: a 5-year follow-up. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(10): 947-53.
49. Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3439-43.
50. Debyle C, Bulkow L, Miernyk K, Chikoyak L, Hummel KB, Hennessy T, Singleton R. Comparison of nasopharyngeal flocced swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2012; 185(1): 89-93.

51. Munywoki PK, Hamid F, Mutunga M, Welch S, Cane P, Nokes DJ. Improved detection of respiratory viruses in pediatric outpatients with acute respiratory illness by real-time PCR using nasopharyngeal flocced swabs. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9): 3365-7.
52. Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, Ghneim R, Zoughbi M, Turkuman S, Rishmawi N, Issa AE, Siriani I, Dauodi R, Kattan R, Hindiye MY. Comparison between pernasal flocced swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2414-7.
53. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6): 1505-8.
54. Mahafzah AM, Landry ML. Evaluation of immunofluorescent reagents, centrifugation and conventional cultures for the diagnosis of adenovirus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12(5): 407-11.
55. Adenovirus DFA Kit, Light Diagnostics, MILLIPORE, ABD & Kanada.
56. Yüksel H, Yılmaz Ö, Akçalı S, Söğüt A, Çiftdoğan AY, Urk V, Ertan P, Şanlıdağ T. Küçük çocuklarda toplum kökenli viral alt solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin sıklığı ve uzun dönem komplikasyonu ile ilişkileri. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 429-35.
57. Aslan SS, Yılmaz G. Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda adenovirus enfeksiyonu insidansının saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2001; 31: 242-4.
58. Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Mdel C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 2: 6.
59. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 320-4.
60. Katırcıoğlu S, Gemicioğlu N, Gökoğlu M, Çölhan İ, Bozkaya E, Vural T, Külekçi M. Kronik tonsillit vakalarında Adenovirus izolasyonunu ve serumda spesifik antikor tayini. *İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü*.
61. Ricart S, Marcos MA, Sarda M, Anton A, Muñoz-Almagro C, Pumarola T, Pons M, Garcia-Garcia JJ. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol* 2012; 10: 1002.

62. Videla C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(1): 17-23.
63. Farng KT, Wu KG, Lee YS, Lin YH, Hwang BT. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35(1): 37-41.
64. Alharbi S, Van Caesele P, Consunji-Araneta R, Zoubeydi T, Fanella S, Souid AK, Alsuwaidi AR. Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. *BMC Infect Dis* 2012; 13; 12:55.
65. Reina J, Ferres F, Gutierrez O, Ruiz de Gopegui E, Gonzalez-Cardenas M. Study of clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections by adenovirus in a pediatric population (1997-2003) *An Pediatr (Barc)* 2004; 61(2): 137-42.
66. Kim YJ, Hong JY, Lee HJ. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4594-9.
67. Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Model C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 2: 6.
68. Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 2007; 45(9): 1120-31.