

# SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU OLAN ASKERLERİN NAZOFARENGEAL ÖRNEKLERİNDE ADENOVİRUS VARLIĞININ VE ALT GRUPLARININ ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF THE PRESENCE AND SUBGROUPS OF ADENOVIRUSES IN NASOPHARYNGEAL SAMPLES OF MILITARY RECRUITS WITH RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Kenan ŞENER<sup>1</sup>, Mehmet YAPAR<sup>1</sup>, Çakır GÜNEY<sup>1</sup>, Ayhan KUBAR<sup>1</sup>, Abdullah KILIÇ<sup>2</sup>, Ertan ALTAYLI<sup>3</sup>, Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara. (tabipks@yahoo.com)

<sup>2</sup> Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup> TSK Sağlık Komutanlığı, Ankara.

### ÖZET

Adenovirüsler (AdV), konjunktivit, ishal, hepatit, sistit, miyokardit ve ensefalit gibi pek çok klinik durumla ilişkili olmasına rağmen, özellikle çocuklarda ve askeri personelde solunum yolu enfeksiyonlarıyla ilişkili önemli viral patojenlerdir. Bu çalışmanın amacı, herhangi bir salgın durumu olmaksızın seçilmiş bir bölgedeki askeri personelde akut solunum yolu hastalığıyla ilişkili AdV'lerin saptanması ve alt gruplarının belirlenmesidir. Çalışmaya, Şubat 2006-Mart 2006 tarihlerinde ateş ( $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ) ve solunum yolu semptomları olan 20-29 yaş arasındaki tamamı erkek 180 askerden alınan boğaz sürüntüsü örnekleri dahil edilmiştir. Tüm örneklerde AdV varlığı HEp-2 hücre kültürlerine ekim ve özgül primerler ve probun kullanıldığı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. AdV'ye özgü sitopatik etkinin görüldüğü pozitif hücre kültürlerindeki üreme, gerçek zamanlı PCR ile de doğrulanmıştır. AdV B, C ve E alt gruplarının ayırımı ise, bu alt gruplara özgül primerlerin kullanıldığı konvansiyonel PCR yöntemiyle yapılmıştır. Alt gruba ait PCR ürünleri, özgül olup olmadıklarının kontrol edilmesi amacıyla *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Çalışmamızda 180 örneğin 8 (%4.4)'inde hücre kültürü ile, 9 (%5)'unda ise gerçek zamanlı PCR ile AdV pozitifliği belirlenmiş, hücre kültüründe pozitif bulunan örneklerin hepsi PCR ile de pozitif sonuç vermiştir. PCR ile pozitif saptanan 9 örnekten 8 (%88.8)'inin E alt grubuna ait olduğu bulunmuş (bu grupta sadece AdV tip 4 yer almaktadır), bu veri restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanmış, bir suş ise mevcut primerlerle tiplendirilememiştir. Sonuç olarak, boğaz sürüntüsü örneklerinde AdV'lerin saptanmasında ve alt grup tayininde gerçek zamanlı TaqMan PCR ve restriksiyon enzim analizinin duyarlı ve özgül yöntemler olduğu belirlenmiş ve çalışma grubumuzda saptanan düşük oran nedeniyle AdV enfeksiyonlarının askerler arasında aşı uygulamasını gerektirecek bir sağlık problemi olmadığı düşüncesine varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Adenovirus, solunum yolu enfeksiyonu, askeri personel.

## ABSTRACT

Adenoviruses (AdV) are important pathogens primarily associated to respiratory infections of children and military staff even though it is also associated to many clinical manifestations, such as cystitis, conjunctivitis, diarrhea, hepatitis, myocarditis, and encephalitis. The goals of this study were to detect and type acute respiratory disease associated AdV isolates among military trainees in a selected region without an evidence of an outbreak. Throat swab samples were obtained during February 2006-March 2006 period, from 180 military male trainees aged 20-29, who were presented with respiratory tract symptoms and an oral temperature of  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ . All specimens were tested by HEp-2 cell culture and real-time TaqMan PCR with AdV specific primers and probes. Positive cell culture results, presented as AdV-specific cytopathic effects, were confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR). AdV subgroup differentiation were performed using conventional PCR assays with the primer set specific for subgroup B, C or E. Subgroup specific PCR products were restricted with *MspI* enzyme in order to check whether they were specific or not. AdV positivity was detected in 8 (4.4%) samples by cell culture and in 9 (5.0%) by the real-time PCR. All culture positive samples were also positive by real-time PCR. Eight of the nine real-time PCR-positive specimens were found to be in the subgroup E (this group contains only AdV type 4) and the results were confirmed with restriction enzyme analysis. One isolate could not be typed with the available primers. These data indicated that both real-time TaqMan PCR and restriction enzyme analysis provide sensitive and specific tools for AdV detection and subgroup differentiation for throat swab specimens. It can be concluded that since the prevalence of AdV infections was low in the study group, AdV infections were not considered as a vaccine requiring health problem in Turkish armed forces, however, larger scale studies were needed to reach a more precise conclusion.

*Key words: Adenovirus, respiratory tract infections, military personnel.*

## GİRİŞ

Adenovirüsler (AdV) hemen hemen bütün organ sistemlerinden izole edilebilmekte olup pek çok klinik sendromla ilişkilidir<sup>1</sup>. AdV enfeksiyonları tüm yıl boyunca endemik olup her yaş grubunda görülebilmektedir. AdV'ler, kış ve ilkbahar aylarında bölgesel solunum yolu enfeksiyonu (SYE) salgınlarına, yaz aylarında yüzme havuzuyla ilişkili farenkokonjunktival ateş salgınlarına ve yılın herhangi bir zamanında endüstriyel göz travması veya oftalmolojik işlemlere bağlı olarak keratokonjunktivit epidemilerine yol açabilmektedir. AdV'lerin bugüne kadar insanlarda hastalık yapan 51 serotipi tanımlanmıştır. AdV'lerle ilişkili üst SYE'ler soğuk algınlığı, farenjit ve tonsillit şeklinde görülmekte olup özellikle 1'den 7'ye kadar olan serotiplerle ilişkilidir. Tıp 1, 2, 5 ve 6 ile oluşan enfeksiyonlarda dikkat çekici bir özellik, yaklaşık %50 olguda virusun adenoid ve tonsillar dokuda latent durumda kalmasıdır. Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt SYE'ler AdV enfeksiyonuna bağlı sık görülen komplikasyonlardır. Özellikle toplu yaşam koşullarında, yenidoğan ünitelerinde salgın şeklinde SYE'lere neden olabileceği bilinmektedir. Bu durumun özellikle 3, 4, 7 ve 21 serotipleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>1</sup>.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, AdV'lerin toplu yaşam koşullarında özellikle de yoğun fiziksel ve psikolojik stresin yaşandığı acemi er eğitim birliklerinde SYE salgınlarına yol açtığı hatta ölümle sonuçlanan olguların olduğu görülmektedir<sup>2</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar, askerler arasında karşılaşılan salgınlarda diğer etkenlerle birlikte AdV'lerin de araştırılması şeklinde olmuş ve sonuçları bilimsel olarak dokümanite edilmemiştir. Bu çalışmada, herhangi bir salgın durumu olmaksızın, ateşle birlikte SYE bulguları olan askerlerin nazofarengeal sürüntü örneklerinde AdV'lerin hücre kültürü ve gerçek

zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle saptanması, PCR ve restriksiyon enzim kesimi yöntemleriyle alt grupların tayin edilmesi ve böylece seçilen bir askeri bölgedeki AdV insidansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Örneklerin Toplanması

Şubat 2006-Mart 2006 tarihleri arasında Ankara Garnizonu'nda bulunan bir askeri birlikte SYE şikayetleri ve ateş ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) ile revire müracaat eden, yaşları 21 ile 35 arasında (ortalama: 23) ve tümü erkek 180 hastadan boğaz sürüntüsü örnekleri steril dakron eküvyon çubuklar ile farens duvarının lateral ve posterior bölgelerinden alındı. Tümü ayaktan tedavi edilen hastaların hepsinde öksürük ve boğaz ağrısı şikayetleri ile farens hiperemisi vardı.

Örnekler streptomisin (100 mg/l) ve penisilin (100.000 U/l) içeren Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) içine konularak soğuk zincir ile laboratuvarımıza gönderildi. Örnekler çalışma zamanına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklandı. Bu çalışmanın tamamı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Örneklerdeki AdV varlığının araştırılmasında hücre kültürü ve AdV DNA'sının araştırılmasında gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı.

### Hücre Kültürü

AdV izolasyonu amacıyla kullanılan insan larenks karsinomu kökenli HEp-2 hücre kültürü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümünden temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarının tümü biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Antibiyotik (streptomisin + penisilin) ve %10 fetal dana serumu içeren MEM vasatı ile tek tabakalı olarak üretilen hücre kültürleri örneklerin ekimi için kullanıldı. Ekimler her örnek için iki kez tekrarlandı ve kültürler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilerek 1 hafta boyunca her gün mikroskopik olarak sitopatik etki (CPE) varlığı yönünden takip edildi. Kontaminasyon veya toksik etki gözlenen örnekler için ekim işlemi tekrarlandı. CPE saptanan örneklerden aşağıdaki şekilde DNA izolasyonu yapıldı ve AdV genel primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile AdV olup olmadıkları kontrol edildi<sup>3</sup>. CPE görülmeyen hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulup çözüldü ve her bir kuyucuk ayrı bir örnek olarak kör pasaj yapıldı. Kör pasajdan sonra hücreler yine her gün mikroskopik olarak CPE yönünden takip edildi. Bir hafta boyunca CPE görülmeyen hücreler yine dondurup çözümlenerek tekrar bir hafta süreyle takip edildi. Bu şekilde kültürler toplam 3 hafta izlenmiş oldu. Bu süre zarfında CPE görülmeyen kuyucuklardaki örnekler negatif kabul edildi. Hücre kültürlerinin hiçbirisinde bakteriyel ya da fungal kontaminasyon saptanmadı.

### DNA İzolasyonu

Hem boğaz sürüntü örneklerinden hem de CPE görülen hücre kültürlerinden AdV DNA'sı araştırmak amacıyla alkali fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemine göre yapıldı<sup>4</sup>. Buna göre; 250 µl reaksiyon tamponu [20 mM (pH: 7.8) Tris-HCl (Sigma/Almanya), 10 mM EDTA (Sigma/Almanya), %0.2 SDS (Sigma/Almanya)] içine 70 mg/ml'lik pronase E (Serva/Danimarka) solüsyonundan 10 µl ve son olarak 100 µl örnek eklendi. Karışım  $42^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda tüplere 500 µl alkali fenol-kloroform-

izoamil alkol (25:24:1) (Amresco/ABD) eklendi ve santrifüj sonunda elde edilen üst sıvı ayrı bir tüpe alındı. Alınan üst sıvının üzerine 500 µl izopropil alkol eklendi ve santrifüj sonrası elde edilen pellet 1000 µl %75'lik etil alkol ile yıkandı. Etanol tamamen uçtuktan sonra elde edilen DNA pelleti 100 µl steril distile su ile tekrar süspanse edildi.

### Primer ve Prob Dizaynı

Çalışmada kullanılan tüm primerlerin ve probun dizaynı OligoYap 3.0 isimli bilgisayar yazılımı yardımıyla yapıldı<sup>5</sup>. AdV ortak primerleri ve prob seçilirken GenBank'tan<sup>6</sup> program arşivine dahil edilen 62 tam genom dizisi kullanıldı. Aynı şekilde B alt grubu için 10, C alt grubu için 5 ve E alt grubu için 8 tam genom dizisi kullanıldı. Dizayn edilen tüm diziler (oligolar) internet yardımıyla GenBank'ın BLAST özelliği (National Institute for Biotechnology Information, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak istenilen bölgeye özgül olup olmadıkları yönünden kontrol edildi. Tüm oligolar MWG-Biotech (Almanya) firmasına sentezlettiildi (Tablo I).

### Gerçek Zamanlı PCR

Bu işlem için önce 0.2 ml'lik optik tüpler içine her bir örnek için son hacmi 20 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı ve bu karışıma 5 µl DNA çözeltisi konuldu. Hazırlanan karışımlar PCR cihazına yerleştirildi. PCR döngüleri Kubar ve arkadaşlarının<sup>7</sup> tanımladığı şekilde 95°C'de 10 dakika [Hot Start Taq DNA Polimeraz (AmpliTaq Gold-DNA Polimerase, Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) aktivasyonu için] ve 40 siklus 95°C'de 15 saniye -60°C'de 1 dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon, verilerin elde edilmesi ve tüm analizler ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazı ile yapıldı.

### Adenovirus Alt Gruplarının Belirlenmesi

AdV yönünden pozitif bulunan örneklerden daha önce açıklandığı gibi DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar gruba özgül (B, C ve E alt grupları) primerler (Tablo I) kul-

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Prob

Adı	Primerler* ve prob** (5'→ 3')	Amplikon uzunluğu (bp)
adenoP1	TCGATGMTGCCSCARTGGKCDTAC	140
adenoProb	JOE CACATCKCSGGVCAGGACGCYTCGGAGTA TAMRA	
adenoP2	GCCACNGTGGGRTTYCTRAACTTGTT	
ADVBP1	CATGATCCATCGTCTCAGCGGCA	789
ADVBP2	CAGGATAATGCTTGGGGAATG	
ADVCP1	GCTGTGACTCCGGTCTTCTAAC	321
ADVCP2	CGGCGCATTATATACCCCTTAAG	
ADVEP1	GCCCAGAAACCGGTGACACA	120
ADVEP2	CGGTCGACGGAATTTGAAAG	

\* M, K, R, S ve Y dejeneratif bazları göstermektedir (Wobble bazlar): M= A/C, K= G/T, R= A/G, S= G/C, Y= C/T, N= Herhangi biri, D= A/G/T, V= A/C/G.

\*\* JOE ve TAMRA proba ait floresan işaretlerdir.

lanılarak konvansiyonel PCR işlemi yapıldı. Elde edilen amplikonların özgül ürünler olup olmadığını kontrol etmek için restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Bu işlemde kullanılacak enzimin seçiminde OligoYap 3.0 isimli bilgisayar yazılımından yararlanıldı<sup>5</sup>. Her alt grup için farklı büyüklüklerde DNA parçaları oluşturan *MspI* enzimi seçildi. Arşivimizde bulunan 8 AdV E alt grubuna ait dizilere göre, C/CGG tanıma bölgesinden kesim yapan bu enzimin 120 baz çift (bp)'lik PCR ürününü yaklaşık 10, 50 ve 60 bp büyüklüğünde üç parçaya ayırması beklenmektedir. PCR işlemi ve restriksiyon enzim kesimi aşağıdaki şekilde uygulandı.

**PCR işlemi:** Son hacmi 40 µl olan ve içerisinde 2 mM dNTP (Sigma/Almanya), 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U *Taq* DNA polimeraz ve 20 pmol sens ve antisens primerler olan reaksiyon karışımına 10 µl DNA ilave edildikten sonra "thermal cycler" cihazında 94°C'de 5 dakika daha sonra her bir siklus 94°C'de 30 saniye, 60-57-54°C'de (sırasıyla; B-C-E grubu) 30 saniye, 72°C'de 35 saniye olmak üzere 40 siklus ve en son uzatma aşaması için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde PCR işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ürünün 5 µl'si jel elektroforezde (%1.5 agaroz, 1 x TBE) 100 bp moleküler standart (K180-250 UL, Amresco, ABD) kullanılarak 200 V'de 15 dakika süreyle yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyandı ve bant görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

**Restriksiyon enzim kesimi:** PCR işlemi sonrası elde edilen amplikonlar *MspI* enzimi ile (New England BioLabs/ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kesildi. Bunun için hazırlanan ve son hacmi 10 µl olan karışıma 1x (1 µl) enzim tamponu (NE buffer 2), 10 U (1 µl) *MspI* enzimi ve 8 µl PCR ürünü konduktan sonra karışım 37°C'de 2 saat bekletildi. Daha sonra restriksiyon enzimle kesilen parçalar %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez işlemi 200 V'de 15 dakika süreyle gerçekleştirildi. Etidyum bromür ile boyanan jeldeki bant görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

## BULGULAR

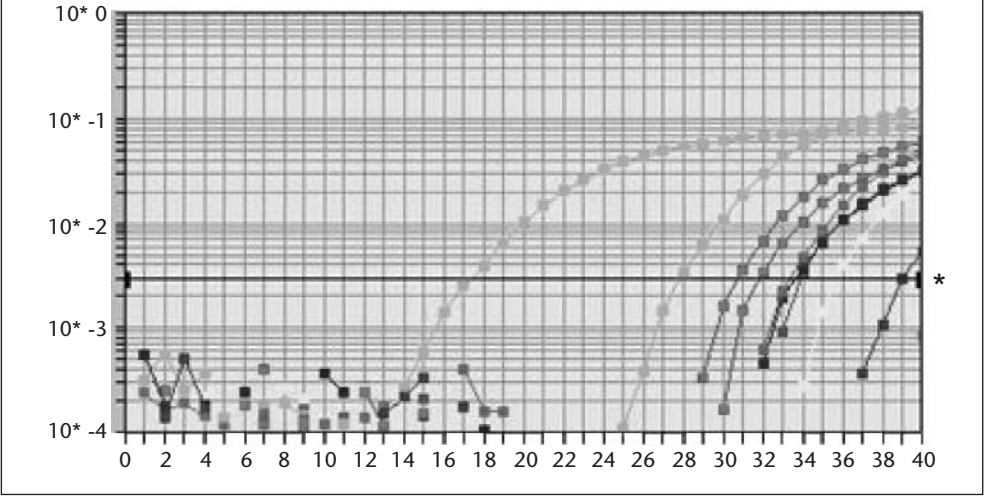
Çalışmaya alınan 180 örneğin 20 (%11.1)'sinde hücre kültürlerinde farklı tipte CPE'ler görülmüş; bu CPE'lerin daha ziyade hücrelerin yuvarlaklaşması ve/veya agregasyon oluşturması şeklinde olduğu izlenmiştir. CPE görülen kuyucuklardaki hücrelerden DNA izolasyonu yapılarak gerçek zamanlı PCR ile incelendiğinde, AdV DNA'sı pozitif bulunan kuyucukların (8/20; %4.4), hücrelerin yuvarlaklaşarak kümeleşme eğilimi gösterdiği kuyucuklar olduğu belirlenmiştir (Tablo II).

**Tablo II. Hücre Kültürü Sonuçları**

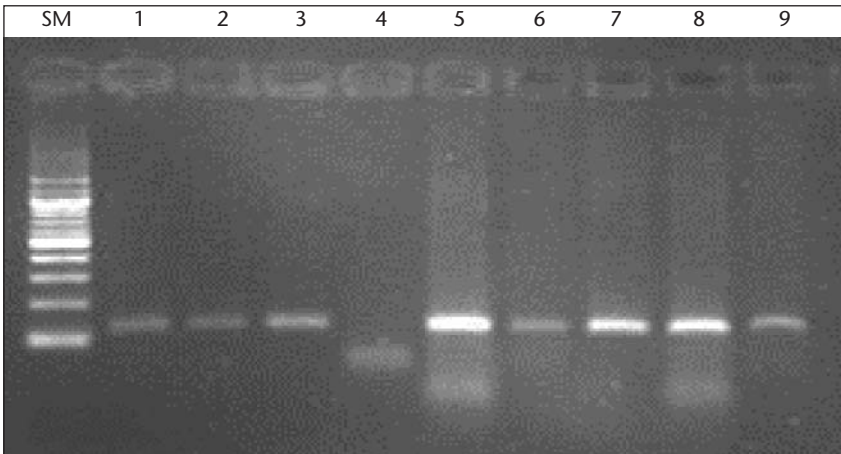
	CPE pozitif olanlar	
	AdV DNA (+)	AdV DNA (-)
İlk ekim	5	7
İkinci pasaj	2	3
Üçüncü pasaj	1	2
Toplam	8	12

Boğaz sürüntüsü örneklerinde AdV DNA'sının doğrudan gerçek zamanlı PCR ile araştırılması sonunda; 180 örneğin 9 (%5)'unda pozitiflik saptanmış, bu örneklerden 8'inin hücre kültürüyle de pozitif bulunan örnekler olduğu belirlenmiştir (Resim 1).

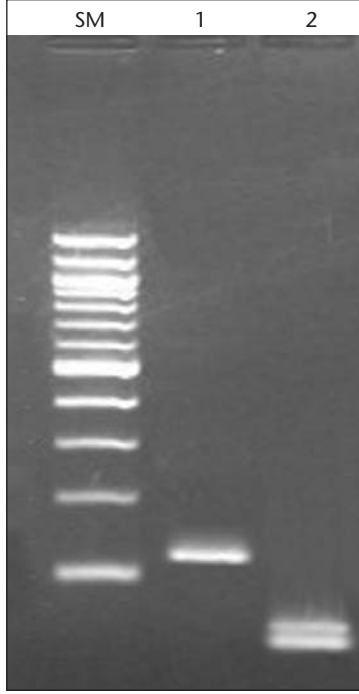
AdV B, C ve E alt gruplarına özgü dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda izolatların hiçbirinde B ve C primerleriyle PCR ürünü oluşmazken, 9 izolatın 8 (%89)'inde E primerleriyle yapılan PCR işlemi sonrası 120 bp bölgesine uyumlu büyüklükte PCR ürünü oluşmuştur (Resim 2). Bu ürünlerin özgül olup olmadıklarını kont-



**Resim 1.** Gerçek zamanlı PCR ile AdV oldukları saptanan izolatlar. X eksenini PCR döngülerinin sayısını Y eksenini normalize edilmiş rapörtör boya emisyon miktarını ( $\Delta R_n$ ) göstermektedir. Yıldız işareti eşik değeri göstermektedir.



**Resim 2.** Adenovirus E alt grubu izolatlarına ait bant görüntüleri (SM: DNA ölçü birimi; 4 no'lu hat haricindekiler pozitif bulunan örneklerdir).



**Resim 3.** Adenovirus E alt grubuna özgü primerler ile elde edilen PCR ürünlerinin *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmesinden sonra elde edilen jel görüntüsü (SM: DNA ölçü birimi 100-1000 bp; 1 no'lu hat alt grup E'ye özgü PCR ürünü, 2 no'lu hat RE kesimi sonrası elde edilen bantlar).

rol etmek için *MspI* restriksiyon enzimi kullanılmış ve kesim sonrası E alt grubuyla uyumlu olarak agaroz jelde 50-60 bp bölgesinde bant oluştuğu görülmüştür (Resim 3). 10 bp'lik DNA parçasının çok hızlı hareket etmesi nedeniyle görülmediği düşünülmüştür.

## TARTIŞMA

Toplu yaşam koşullarında bulunan askerler arasında SYE'lere sık rastlanmaktadır. İmmünitenin baskılanması, fiziksel ve mental stres, birliklerin sık yer değiştirmesi ve buna bağlı olarak yeni virus suşlarıyla temas SYE'lerin sıklığını artıran risk faktörleridir<sup>8</sup>. AdV'ler, salgınlara ve bazen ölümlü sonuçlanabilen solunum yolu enfeksiyonlarına yol açabilmesi yönüyle büyük öneme sahiptir. AdV'lere bağlı enfeksiyonlar sıklıkla hayatın ilk yıllarında görüldüğü için ülkemizde konuyla ilgili son 20 yıl içerisinde yapılan sınırlı sayıda çalışma, daha çok okul öncesi ve okul çağı çocuklarıyla ilgilidir<sup>9-13</sup>. Türk Silahlı Kuvvetlerinde konuyla ilgili ilk çalışmalar 1960'lı yılların sonlarında yapılmıştır<sup>14</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise ortaya çıkan salgınlarda diğer etkenlerle birlikte AdV'lerin de araştırılması şeklinde olmuştur. Bu çalışma, hem konvansiyonel hem de moleküler yöntemler kullanılarak, herhangi bir salgın durumu olmaksızın toplu yaşam koşullarına maruz kalan ve SYE şikayetleri olan askerlerde AdV'lerin araştırılması, saptanan suşların alt gruplarının belirlenmesi ve sonuçta da elde edilen verilerin dökümanite edilmesi yönüyle yapılan ilk çalışma sayılabilir.

AdV'lerin laboratuvar tanısında kültür "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Ancak AdV'lerin kültürde replike olabilmeleri için örneğe ve örnek içinde bulunan virus konsantrasyonuna bağlı olarak 3 gün ile 3 hafta arasında bir süreye ihtiyaç vardır. Ayrıca kültürde üretilebilmesi için virusların canlı olması gerekmektedir. Uygun şekilde alınıp uygun koşullarda laboratuvara gönderilmezlerse veya örnek alımı ile kültür ekimi arasında uzun bir süre varsa AdV'ler inaktive olabilmektedir. Bakteriyel kontaminasyon veya örneğin kendi toksik etkisine bağlı olarak da virus izolasyonu engellenebilir<sup>15</sup>. Bu çalışmada ilk ekimden sonra AdV'lere bağlı CPE en erken 3. günde en geç ise 3. pasajın 4. gününde (18. günde) oluşmuştur. Bakteriyel kontaminasyon ise hiç görülmemiştir. Hücre kültüründe CPE oluşan hücrelerden AdV tanımlanması, konvansiyonel olarak AdV'lerin hekzon antijenine karşı oluşan monoklonal veya poliklonal antikorların kullanıldığı immüno floresan (IF) yöntemiyle yapılabilmektedir<sup>1</sup>. Bu çalışmada ise CPE görülen hücrelerde AdV tanımlanması için hücrelerden DNA izolasyonunu takiben moleküler bir yöntem olan gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Nazofarengeal sürüntü örneklerinin homojen olmaması ve örnekler arasında alımdan kaynaklanan değişkenlik olması nedeniyle kantitasyon yapmak pratik olarak anlamlı değildir<sup>16</sup>. Bu çalışmada kantitatif sonuç verebilen gerçek zamanlı PCR yönteminin kullanılmasındaki amaç kantitasyon yapmak değil, daha hızlı sonuç verebilen, güvenilir ve daha duyarlı bir yöntemin kullanılmasıdır. AdV'lerin saptanmasında kullanılmak üzere bugüne kadar pek çok PCR protokolü tanımlanmıştır<sup>17-20</sup>. Ancak bunların tümünde PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromürle boyamayı takiben UV altında görüntülenmesi gibi aşamalar vardır ve bunlar hem zaman alıcı hem de kontaminasyon riski taşımaktadır. Ayrıca duyarlılığı da gerçek zamanlı PCR yöntemine göre daha düşüktür<sup>16,21</sup>. Tek basamaklı PCR yönteminin duyarlılığını artırmak için "nested" primerlerle ikinci bir PCR işlemi yapmak mümkündür<sup>22</sup>. Ancak bu da zaman alıcı olup kontaminasyon riskini beraberinde getirmektedir. Yapılan bazı çalışmalar, gerçek zamanlı PCR yönteminin AdV'lerin tanımlanmasında "altın standart" kabul edilen hücre kültürü yönteminden de daha duyarlı olduğunu göstermektedir<sup>3,18,23</sup>. Bu çalışmada da hücre kültürüyle 180 örnekten 8 (%4.4)'i pozitif bulunurken gerçek zamanlı PCR yöntemiyle 180 örnekten 9 (%5)'u pozitif olarak bulunmuştur. Tüm bu nedenlerden dolayı bu çalışmada gerçek zamanlı PCR yönteminin seçilmesinin uygun olduğu kanısına varılmıştır. Gerçek zamanlı PCR ile pozitif bulunan örneğin hücre kültürüyle negatif bulunmasının nedeninin yukarıda sayılan virus izolasyonunu engelleyen nedenlerden birisi olabileceği düşünülmüştür.

İmmün süpresif hastalarda sitomegalovirus, Epstein-Barr virus ve AdV'lere bağlı enfeksiyonların takibinde lökositlerdeki veya plazmadaki viral yükün kantitasyonu oldukça değerlidir<sup>24</sup>. Özellikle dissemine adenoviral hastalıklardaki antiviral tedavinin takibi ve kök hücre nakli yapılanlarda AdV DNA yükünün izlenmesinde AdV'lerin kantitatif olarak saptanması önemlidir<sup>24,25</sup>. Bu çalışma için dizayn edilen primerler ve prob sayesinde her türlü klinik örnekte adenoviral kantitasyon yapılabilecek olması bu çalışmanın sekonder bir kazanımı olarak değerlendirilmiştir.

Toplu yaşam koşullarına maruz kalınan askeri birliklerde SYE salgınlarına sık rastlanmaktadır. Bu nedenle ABD ordusundaki askerlere AdV'lere karşı koruyucu olarak 1970'li



yıllarda FDA (Food and Drug Administration) onaylı enterik kaplı kapsül verilmeye başlanmıştır<sup>1</sup>. Ancak ekonomik nedenlerden dolayı aşığı üreten tek firma (Wyeth-Lederle Vaccines-St. David, PA) 1996 yılında aşığı üretimini durdurmuştur. ABD ordusunda acemi askerler arasında yeniden AdV'lerle ilişkili salgın şeklinde SYE görülmesi üzerine konuyla ilgili epidemiyolojik, klinik ve moleküler tanı ve tiplendirmeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır<sup>6,8,26-31</sup>. Bu çalışmalardan birinde Ekim 1996-Haziran 1998 tarihleri arasında %78'i erkek olmak üzere semptomatik hastalardan alınıp incelenen 3413 boğaz kültürünün 1841 (%53)'inden AdV izole edilmiştir. Bulunan tipler 4, 7, 3 ve 21; yüzdeleri ise sırasıyla %57, %25, %9 ve %7'dir<sup>26</sup>. Yine başka bir çalışmada, 1997-1998 yılları arasında görülen bir salgında hastane tedavisine alınan toplam 126 hastaya ait boğaz sürüntü örneğinden hücre kültürü ile 99 (%79)'unda ve PCR ile 100 (%79)'ünde AdV pozitifliği bulunmuştur. Bunların %88'i tip 4, %9'u tip 3 ve %3'ü tip 21 olarak tanımlanmıştır<sup>28</sup>. ABD ordusunda 1997 yılında bir birlikte ortaya çıkan salgında 119 kişiden 57 (%47.9)'sinde, başka bir birlikte ise 147 kişiden 73 (%49.7)'ünde hücre kültürüyle boğaz sürüntü örneklerinde tip 4 AdV pozitifliği bulunmuştur<sup>30</sup>. AdV tip 4 sıklıkla askerlerde ve nadiren sivillerde salgınlara neden olurken, ABD'de 1966-2000 yılları arasında görülen AdV tip 7 enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi incelendiğinde tip 7'nin sivil popülasyonda sıklıkla salgınlara neden olabildiği görülmüştür<sup>32</sup>. Ülkemizde Türk Silahlı Kuvvetleri'nde AdV'lerle ilgili ilk çalışmalar 1960'lı yılların sonunda Sağlam ve arkadaşları<sup>14</sup> tarafından yapılmış ve en sık görülen tipler 3, 4, 5, 6 ve 7 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın amaçlarından biri seçilmiş askeri bir bölgedeki AdV sıklığını ortaya koymaktır. Çalışmamızın verilerine göre, Türk ordusunda AdV'lerin aşığı kullanımına gerek duyulacak seviyede bir sağlık problemi olmadığı yönünde bir kanaat oluşmuştur. Ancak gelecekte daha geniş ve geneli temsil edebilecek popülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilecek verilere göre daha sağlıklı önerilerde bulunmak mümkün olacaktır. Kaygusuz ve arkadaşlarının<sup>11</sup> SYE şikayetiyle hastaneye başvuran çocuk ve yetişkinlerde bakteriyel ve viral antijenleri IF yöntemiyle araştırdıkları çalışmada, AdV sıklığı 76 çocukta %3.9, 135 yetişkinde %14.8 olarak bulunmuştur. Ülkemizde çocukluk çağında AdV enfeksiyonları ile ilgili yapılan serolojik bir çalışmada, SYE olanlarda %28 oranında AdV pozitifliği bulunmuş, en sık AdV görülme yaşınının 13-24 ay arasında olduğu belirtilmiştir<sup>10</sup>. Söyletir ve arkadaşları<sup>33</sup> da, 0-15 yaş grubunda 206 çocukta AdV gruba özgül antikor pozitifliğini %4.8 olarak bildirmişler, en yüksek seropozitifliğin 0-2 yaş arası çocuklarda olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada, 50 alt SYE olan çocukta AdV sıklığı hücre kültürüyle %10 (5/50) olarak bulunmuş, bu oran üst SYE olan 45 çocuk için %6 (3/45) olarak verilmiştir<sup>9</sup>. Ege bölgesinde 1995-1996 yılları arasında kış mevsiminde görülen SYE etkenleriyle ilgili yapılan bir başka çalışmada, 131'i çocuk, 56'sı erişkin (32'si acemi er) influenza benzeri hastalık tablosuna sahip hastalarda hücre kültürünü takiben IF yöntemiyle %3.7 (7/187) oranında AdV pozitifliği saptanmıştır<sup>13</sup>. Bu 7 izolattan 5'i erişkin yaş grubuna ait olup tümü acemi erlerdir. Bu çalışmaya dahil edilen acemi askerler arasında AdV pozitifliği %15.6 (5/32) olarak bulunmuştur<sup>13</sup>.

Çalışmamızda bir salgın durumu olmaksızın SYE semptomları ile revire müracaat eden ve ayaktan tedavi edilen askerlerin boğaz sürüntüsü örneklerinde %5 (9/180) oranında

AdV pozitifliği saptanmıştır. AdV oranının başka ordulardaki askerlerle ilgili yapılan çalışmalara göre düşük olduğu görülmüş; bunun nedeninin çalışmaya alınan popülasyonda bir salgın durumu olmamasına ve ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde virüsle karşılaşma yaşının düşük olması nedeniyle askerlik çağındaki popülasyonun AdV'lere karşı bağışık olmalarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Pozitif saptanan 9 örnekten 8 (%88.8)'inin E alt grubuna ait olduğu bulunmuş, bir suş ise elimizdeki primerlerle tiplendirilememiştir. Bilindiği üzere E alt grubunda sadece AdV tip 4 bulunmaktadır. Başka bir deyişle pozitif örneklerin büyük çoğunluğu (%88.8) literatürle uyumlu şekilde tip 4 olarak saptanmıştır. Tip 4 AdV'lerin özellikle asker popülasyonunda salgınlara yol açtığı bilinmekle birlikte, bu suşlar çalışmamızda herhangi bir salgın durumu olmaksızın izole edilmiştir. Bu çalışmada izole edilen tip 4 AdV'lerin salgına yol açmamasının nedeni, askerlerimizin bağışık olmaları veya bizim izolatlarımızın salgınla ilişkisiz genom tiplerinden birine ait olması olabilir. Ancak bunun ortaya konulması için daha detaylı bir moleküler epidemiyolojik çalışmaya gereksinim vardır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmayla hem "altın standart" bir yöntem olan konvansiyonel hücre kültürüyle hem de kısa sürede ve güvenilir bir şekilde sonuç veren, bazı çalışmalara göre hücre kültüründen bile duyarlı olan gerçek zamanlı PCR yöntemiyle, SYE'lerde sık karşılaşılan AdV'lerin, seçilen askeri bir bölgedeki nazofarengeal sıklığı alt grup düzeyinde belirlenmiştir. Bu çalışmanın ülkemizde gelecekte yapılacak AdV çalışmaları için veri tabanı oluşturması, hücre kültürü ve moleküler yöntemlerle ilgili laboratuvar pratiğimizi artırması, daha önce konvansiyonel PCR ile AdV araştırılması yapılan laboratuvarımıza, dizayn edilen primerler ve prob kullanılarak her türlü klinik örnekte adenoviral kantitasyona imkan veren bir testin kazandırılması yönleriyle faydalı olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Swenson PD, Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenoviruses, pp: 1404-17. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
2. Ryan MAK, Gray GC, Binn LN, et al. Two fatal cases of adenovirus related illness in previously healthy young adults-Illinois, 2000. Morb Mortal Wkly Rep 2001; 50: 553-5.
3. Rola A, Przybylski M, Dzieciatkowski T, Turowska A, Luczak M. Detection of human adenoviruses with real-time PCR assay using TaqMan fluorescent probes. Med Dosw Mikrobiol 2007; 59: 371-7.
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, Book 3, Appendices B16. 1998, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
5. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one step real-time reverse transcriptase PCR. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 358-62.
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>, Erişim tarihi: 16.03.2005
7. Kubar A, Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. J Periodont Res 2004; 39: 81-6.
8. Sanchez JL, Binn LN, Innis BL, et al. Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits: epidemiologic and immunologic risk factors in healthy, young adults. J Med Virol 2001; 65: 710-8.
9. Aslan SS. Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda adenovirus enfeksiyonu prevalansının saptanması. Yüksek Lisans Tezi. 1998, İstanbul.

10. Baskın E. Çocukluk çağında adenovirus enfeksiyonları. Uzmanlık Tezi. 1992, Sivas.
11. Kaygusuz S, Köksal İ, Aydın K, Çaylan R. Investigation of atypical bacteria and virus antigens in respiratory tract infections by use of immunofluorescence method. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 33-6.
12. Saçkesen C, Pinar A, Şekerel BE, Akyön Y, Saraçlar Y. Use of polymerase chain reaction for detection of adenovirus in children with or without wheezing. *Turk J Pediatr* 2005; 47: 227-31.
13. Yamazhan T. 1995-1996 kış mevsiminde, hücre kültürü yöntemi ile bölgemizde saptanan adenovirus, solunum sinsityal virus ve parainfluenza virus enfeksiyonları. Uzmanlık Tezi. 1998, İzmir.
14. Unat EK. Adenoviridae ailesi, s: 985-91. *Tıp Bakteriyojisi ve Virolojisi*. 1982, Dergah Tıp Yayınları, İstanbul.
15. Horwitz M. Adenoviruses, pp: 2149-97. In: Fields BN (ed), *Virology*. 1996, 3<sup>rd</sup> ed. Raven, New York.
16. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003; 70: 228-39.
17. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 137: 149-57.
18. Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Carache P. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3223-6.
19. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, McDonough MM. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1886-91.
20. Pring-Akerblom P, Adrian T. Type- and group-specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. *Res Virol* 1994; 145: 25-35.
21. Faix DJ, Houg HH, Gaydos JC. Evaluation of a rapid quantitative diagnostic test for adenovirus type 4. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 391-7.
22. Allard A, Albinsson B, Wadell GR. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505.
23. Echavarria M, Kolavic SA, Cersovsky S, et al. Detection of adenoviruses (AdV) in culture-negative environmental samples by PCR during an AdV-associated respiratory disease outbreak. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2982-4.
24. Lankester AC, van Tol MJ, Claas EC, Vossen JM, Kroes AC. Quantification of adenovirus DNA in plasma for management of infection in stem cell graft recipients. *Clin Infect Dis* 2004; 34: 864-7.
25. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, et al. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 45-54.
26. Gray GC, Goswami PR, Malasig MD, et al. Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 663-70.
27. Barraza EM, Ludwig SL, Gaydos JC, Brundage JF. 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.
28. Echavarria M, Sanchez JL, Kolavic SA, et al. Rapid detection of adenovirus in throat swab specimens by PCR during respiratory disease outbreaks among military recruits. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 810-2.
29. Gray GC, Callahan JD, Hawksworth AW, Fisher CA, Gaydos JC. Respiratory diseases among U.S. military personnel: countering emerging threats. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 379-87.
30. McNeill KM, Benton FR, Monteith SC, Tuchscherer MC, Gaydos JC. Epidemic spread of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease between U.S. army installations. *Emerging Infect Dis* 2000; 6: 415-9.
31. McNeill KM, Hendrix RM, Lindner JL, et al. Large, persistent epidemic of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease in U.S. army trainees. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 798-801.
32. Erdman DD, Xu W, Gerber SI, et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 269-77.
33. Söyletir G, Us D, Cerikcioğlu N, Babacan F. Frequency of adenovirus group complement-specific antibodies in children. *Mikrobiyol Bul* 1990; 24: 16-9.