



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KONJONKTİVİTLİ HASTALARDA ADENOVİRÜSÜN
ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ash KİRAZ

KAYSERİ-2013



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KONJONKTİVİTLİ HASTALARDA ADENOVİRÜSÜN
ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Aslı KİRAZ

**Danışman
Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSU-11-3645 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ – 2013

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım süresince benden bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU'na, Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ'a ve eğitimimde emeği geçen bütün Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Başta Bil. Uzm. Bio. Osman ÖZÜBERK, Dr. F.Filiz TEKİNŞEN ve Bio.Hanife KARAHANÇER olmak üzere asistanlık yıllarımın ve tez çalışmalarımın birçok aşamasında her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen değerli dostlarıma, asistan arkadaşlarıma ve bütün Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

TSU-11-3645 no'lu tez projem Erciyes Üniversitesi Proje Değerlendirme ve İzleme tarafından desteklendiği için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında her türlü destek olan aileme, dualarını benden esirgemeyen sevgili anneme ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. SINIFLANDIRMA	3
2.3. GENEL ÖZELLİKLER VE ANTİJENİK YAPI.....	4
2.4. ADENOVİRÜS'ÜN HÜCRE İÇİNE GİRİŞİ VE REPLİKASYONU	5
2.5. FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKİLERE DİRENÇ	8
2.6. PATOLOJİ VE PATOGENEZ.....	9
2.7. KLİNİK ÖZELLİKLERİ.....	9
2.7.1. Göz Enfeksiyonları	9
2.7.2. Solunum Sistemi Enfeksiyonları	10
2.7.3. Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları.....	11
2.7.4. Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları	11
2.8. LABORATUVAR TANI	12
2.8.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	12
2.8.2. Direkt İnceleme.....	13
2.8.2.1. Viral Partikül Tayini	13
2.8.2.2. Antijen Tayini.....	13
2.8.2.3. Moleküler Yöntemler.....	14
2.8.3. Virüs İzolasyonu	14
2.8.4. Serolojik Yöntemler	15
2.8.5. Tiplendirme	15
2.9. EPİDEMİYOLOJİ.....	16
2.10. KORUNMA.....	16

2.11. TEDAVİ	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. ÖRNEKLER	18
3.2. <i>ADENOVİRÜS</i> DNA’NIN PCR İLE ARAŞTIRILMASI.....	18
3.3. <i>ADENOVİRÜS</i> ’ÜN KONVANSİYONEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU.....	21
3.4. <i>ADENOVİRÜS</i> ’ÜN SHELL-VİAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU.....	28
4. BULGULAR	30
4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI	30
4.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE HEP-2 HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI	30
4.3. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE SHELL-VİAL HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI.....	33
4.4. PCR, HEP-2 VE SHELL-VİAL HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	41
7. KAYNAKLAR	42
8. TEZ ONAY SAYFASI.....	48

KISALTMALAR

A549	: İnsan alveoler bazal epitelyal hücre kültürü
AdV	: Adenovirüs
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CAR	: Cocksackie-Adenovirüs reseptörleri
CD	: Cluster of differentiation
cm	: Santimetre
CPE	: Sitopatik etki
DFA	: Direkt immünofloresan antikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EIA	: Enzyme immunoassay
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
EM	: Elektron mikroskopi
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
gr	: gram
HAI	: Hemaglutinasyon inhibisyon
HEK	: İnsan embriyonik böbrek hücre kültürü
HeLa	: İnsan serviks kanseri hücre kültürü
HEp-2	: İnsan laringeal epidermoid karsinom hücre kültürü
IC	: İmmünokromatografi
IF	: İmmünofloresan
IFN	: İnterferon
Ig G	: İmmünoglobülin G

Ig M	: İmmünoglobülin M
kb	: kilobaz
KBD	: Kompleman birleşme deneyi
mg	: miligram
MHC	: Major histocompatibility complex
mL	: mililitre
µL	: mikrolitre
µm	: mikrometre
mM	: milimolar
mRNA	: messenger RNA
nm	: nanometre
PBS	: Phosphate buffer solution
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
pH	: Potansiyel hidrojen
ppm	: Parts per million
Rb	: Retinoblastoma
REA	: Restriksiyon enzim analizi
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RIA	: Radioimmunoassay
rpm	: rotation per minute
TNF	: Tumor necrosis factor
U	: Ünite
UV	: ultraviyole

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1.	Adenoviral hastalıklar, ilişkili serotipler ve konaklar	6
Tablo 2.	Konjonktival sürüntü örneklerinde PCR ve HEp-2 hücre kültürü bulgularının karşılaştırılması	32
Tablo 3.	Shell-vial hücre kültürüne ekilen konjonktival sürüntü örneklerinin PCR yöntemi ile karşılaştırılması	33
Tablo 4.	Shell-vial hücre kültürüne ekilen konjonktival sürüntü örneklerinin HEp-2 hücre kültürü yöntemi ile karşılaştırılması	33
Tablo 5.	Konjonktival sürüntü örneklerinde PCR, HEp-2 hücre kültürü ve shell-vial hücre kültürü bulgularının karşılaştırılması	35
Tablo 6.	PCR ve shell-vial hücre kültürü yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri	35
Şekil 1.	Adenovirüslerin hücre içine girişi ve replikasyonu	8
Şekil 2.	Tek tabaka halindeki HEp-2 hücre kültürü	31
Şekil 3.	HEp-2 hücre kültüründe <i>Adenovirüs</i> 'ün yaptığı sitopatik etki (8.gün)	31
Şekil 4.	HEp-2 hücre kültüründe direkt immünofloresan (Argene, Fransa) yöntemi ile <i>Adenovirüs</i> antijeninin gösterilmesi	32
Şekil 5.	Shell-vial hücre kültüründe direkt immünofloresan yöntemi ile <i>Adenovirüs</i> antijeninin gösterilmesi	34

KONJONKTİVİTLİ HASTALARDA ADENOVİRÜSÜN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Adenovirüsler, toplum kökenli ve nozokomiyal viral konjonktivit salgılarının en sık görülen etkenidir. Fiziksel ve kimyasal etkenlere dirençli olmaları, kolay bulaşabilmeleri nedeniyle adenoviral göz enfeksiyonlarının hızlı ve doğru tanısı çok önemlidir. Bu çalışmada, adenoviral konjonktivit şüpheli hastaların konjonktival sürüntü örneklerinden hücre kültürü ve PCR yöntemleri uygulanarak *Adenovirüs* araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Mart 2012- Aralık 2012 tarihleri arasında adenoviral konjonktivit düşünülen 50 hastadan konjonktival sürüntü örneği alındı. Örneklerde *Adenovirüs* DNA real-time PCR (Qiagen, Almanya) yöntemi ile araştırıldı. Örnekler HEp-2 hücre kültürüne ve shell-vial hücre kültürüne ekildi. HEp-2 hücre kültüründe virüs izolasyonu, iki farklı immüno Floresan kiti (Argene, Fransa) ve (Vircell, İspanya) kullanılarak doğrulandı. Hücre kültürü altın standart kabul edilerek PCR ve shell-vial hücre kültürü yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı.

Sonuçlar: PCR yöntemiyle 50 adet konjonktival sürüntü örneğinden 23'ünde (%46) *Adenovirüs* DNA tespit edildi. HEp-2 hücre kültüründe 19 (%38) örnek Argene kiti ile, 13 örnek ise Vircell kiti ile gösterildi. Shell-vial hücre kültürü sadece 24 klinik örneğe uygulanabildi ve 17 örnekte üreme saptandı. Bu yöntemle pozitif bulunan 17 örnek, aynı zamanda PCR ve HEp-2 hücre kültürü yöntemleriyle de pozitif olarak bulundu. Dört örnekte *Adenovirüs* DNA pozitif olmasına rağmen her iki hücre kültürü yöntemiyle de virüs izole edilemedi. İki örnek PCR ve HEp-2 hücre kültürü yöntemleriyle pozitif bulunurken, shell-vial hücre kültüründe *Adenovirüs* izole edilemedi. PCR yönteminin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 87, shell-vial hücre kültürü yönteminin duyarlılığı % 89 ve özgüllüğü % 100 olarak belirlendi.

Tartışma: Adenoviral göz enfeksiyonlarında hücre kültürü yöntemi halen önemini korumakla beraber hızlı tanı sağlayamamakta, ayrıca deneyimli personel ve donanımlı laboratuvar ortamı gerektirmektedir. Shell-vial hücre kültürü yöntemi, nisbeten daha hızlı sonuç vermektedir ancak iki örnekte HEp-2 hücre kültüründe virüs üretilmesine rağmen shell-vial hücre kültüründe üretilenmemiştir. Hücre kültürü yöntemlerine kıyasla en kısa sürede sonuç veren ve duyarlılığı son derece yüksek olan real-time PCR yönteminin, adenoviral göz enfeksiyonlarının tanısında kullanılmasının daha uygun olacağı kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Adenovirüs*, hücre kültürü, konjonktivit, PCR.

INVESTIGATION OF ADENOVIRUSES IN PATIENTS WITH CONJUNCTIVITIS BY VARIOUS METHODS

ABSTRACT

Purpose: Adenoviruses are the most common causative agents of epidemics of community acquired and nosocomial conjunctivitis. Adenoviruses are resistant to physical and chemical factors and they can spread easily. Due to these factors, rapid and accurate diagnosis is very important in adenoviral eye infections. In this study, it was aimed to investigate adenoviruses from conjunctival swab samples of patients suspected of adenoviral conjunctivitis by cell culture and PCR methods.

Materials and Methods: Conjunctival swab samples from patients suspected of adenoviral conjunctivitis were taken between March 2012- December 2012. *Adenovirus* DNA was investigated by real-time PCR (Qiagen, Germany) method in specimens. Samples were inoculated on HEp-2 cell culture and shell-vial cell culture. Virus isolation in HEp-2 cell culture was confirmed with two immunofluorescence kits (Argene, France) and (Vircell, Spain). Considering HEp-2 cell culture as gold standart, sensitivities and specifities of PCR and shell-vial culture methods were calculated.

Results: *Adenovirus* DNA was found positive in 23 (%46) of 50 conjunctival samples by real-time PCR. Virus isolation in HEp-2 cell culture was shown in 19 (38%) samples by Argene kit and 13 (26%) samples by Vircell kit. Shell-vial culture could be performed in 24 swab samples and 17 of samples were found positive. These 17 samples that found positive in shell-vial culture were also positive with PCR and HEp-2 cell culture methods. Additionally, 4 samples were found positive by PCR but we could not isolate adenovirus by HEp-2 and shell-vial cell culture methods. Two samples that were found positive with PCR and HEp-2 cell culture methods were found negative by shell-vial cell culture. The sensitivities and specifities were found as % 100 and % 87 respectively for PCR, % 89 and % 100 respectively for shell-vial cell culture.

Conclusion: The cell culture method is still important in adenoviral eye infections but can not provide rapid diagnosis. Additionally, cell culture method requires experienced staff and well-equipped laboratory conditions. Shell-vial cell culture method provides relatively more rapid diagnosis but adenoviruses could not be isolated by shell-vial cell culture in two samples that were found positive by PCR and HEp-2 cell culture methods. In adenoviral eye infections, compared with the cell culture methods, it is considered that real-time PCR is a more useful method that gives results in the shortest period of time with high sensitivity.

Keywords: *Adenovirus*, cell culture, conjunctivitis, PCR.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan Adenovirüsleri, *Mastadenovirus* cinsinde *Adenoviridae* ailesi içinde yer alan, milyonlarca insanı enfekte ederek konjonktivit, solunum yolu enfeksiyonları, genitoüriner enfeksiyonlar, gastroenterit gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olan virüslerdir (1,2). Adenovirüsler, dünya genelinde konjonktival enfeksiyonların % 15-70'inde başlıca etkenlerdir (3). Adenoviral göz enfeksiyonları klinik olarak foliküler konjonktivit, faringokonjonktival ateş ve epidemik keratokonjonktivit şeklinde görülmektedir (4).

Adenovirüslerin etken olduğu salgınlara sıklıkla rastlanmaktadır (5). Çevresel etkenlere yüksek düzeyde dirençli olmaları nedeniyle oda sıcaklığında haftalarca enfeksiyöz özelliğini korumakta, sonuç olarak da bulaş kolaylıkla meydana gelebilmektedir (5,6). Bulaş kişiden kişiye olabildiği gibi su, objeler ve tıbbi cihazlar aracılığıyla da olmaktadır. Bu nedenle nozokomiyal enfeksiyonlar da görülebilmektedir (6).

İnsanlarda hastalık etkeni olan adenovirüslerin günümüzde bilinen 57 serotipi ve 7 türü (A-G) mevcuttur (5,7). Konjonktivit etkeni olarak öne çıkanlar AdV 1-11, 15, 16, 17, 19, 20 ve 22 serotipleridir (3). Epidemik keratokonjonktivite sıklıkla AdV 8, 19, 37 serotipleri neden olmakla beraber AdV 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 21, 22, 29, 34, 53, 54 ve 56 serotipleri de etkenler arasındadır (3,8). Faringokonjonktival ateş genellikle çocukları etkilemekte olup AdV 3, 4 ve 7 serotipleri en sık görülen etkenlerdir (3,9).

Adenovirüs enfeksiyonlarının tanısı çoğunlukla hücre kültüründe virüs izolasyonu, nükleik asit ve antijen belirlenmesi gibi direkt yöntemlerle yapılmaktadır (6,10).

Serolojik yöntemlerin kullanıldığı indirekt tanı ise düşük duyarlılık olmasından dolayı tanıdan çok epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (10).

Adenoviral göz enfeksiyonlarında, özellikle nozokomiyal konjonktivit salgınlarında hızlı tanı; klinik tanının doğrulanması, nozokomiyal yayılımın sınırlandırılması, uygun koruyucu tedbirlerin alınması ve uygun olmayan tedavinin engellenmesi açısından gereklidir (11). Gerek toplum, gerekse hastane kaynaklı salgınlarda enfekte bireylerin derhal izole edilmeleri, salgınlara kontrol altına alınması açısından kritik öneme sahiptir (12).

Bu çalışmada, adenoviral konjonktivit şüpheli hastaların konjonktival sürüntü örneklerinden hücre kültürü ve PCR yöntemleri uygulanarak *Adenovirüs* araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Adenovirüslerin keşfedilmesi 1950’li yıllarda gerçekleşmiştir (13). Hilleman ve Werner, 1952-53 yıllarında Fort Wood’ta bir askeri birlikte meydana gelen primer atipik pnömoni salgını sırasında askerlerin boğaz çalkantı sularında yeni bir virüse rastladılar (10). Rowe ve arkadaşları, 1953’te rutin adenoidektomi yapılan çocukların adenoid doku kültürlerinde spontan dejenerasyon olduğunu gözlemledi ve bunu bir adenoid dejenere edici ajan varlığı ile açıklamaya çalıştı. Her iki grup üzerinde yapılan testler sonucu her iki ajanın immünolojik olarak bağlantılı olduğu sonucuna varıldı. Başlangıçta bu virüsler ‘adenoid dejenere edici ajan’ ve ‘RI-67’ ‘‘respiratory infection from recruit 67’’ olarak adlandırıldı. Ancak 1956’da bu virüsler ilk olarak adenoid dokulardan elde edildiği için ‘Adenovirüs’ terimi benimsendi (10). Bu keşiften sonraki yıllarda aynı gruba ait olan birçok virüs insanlardan ve birçok değişik hayvan türünden izole edilmiştir (14).

2.2. SINIFLANDIRMA

Adenovirüsler, *Adenoviridae* ailesinin dört cinsinden biri olan *Mastadenovirus* cinsinde yer almaktadır (14). Diğer üç cinsi ise *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* ve *Siadenovirus* cinsleridir. *Aviadenovirus* cinsi kuşları infekte eden virüslerden oluşmaktadır. *Atadenovirus* cinsi genomunda yüksek oranda adenin ve timin içerdiği için bu şekilde adlandırılmış olup kuşlardan, sürüngenlerden, keseli hayvanlardan ve geviş getiren hayvanlardan izole edilmiştir. *Siadenovirus* cinsi ise sialidaz homolog geni olarak

varsayılan genin tanımlanması ile bu adı almıştır ve kuşlar ile çift yaşayışlı canlılardan izole edilen virüsleri içermektedir (10).

Mastadenovirus cinsi, adını Latince ‘*mastos*’ (meme) kelimesinden almış olup insanın da içinde bulunduğu memelileri enfekte eden virüslerden oluşmaktadır (10). İnsan adenovirüsleri bu cins içinde yer almaktadır. Şimdiye kadar tanımlanmış olan toplam 57 serotipten oluşmaktadır ve bu serotipler yedi tür içinde (A-G) toplanmış durumdadır (7,15). Bu türlerin ayrımı genom büyüklüğü, kompozisyon ve organizasyonu, DNA homolojisi, hemaglutinasyon özellikleri, nötralizasyon ve onkojenik özellikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (16,17).

2.3. GENEL ÖZELLİKLER VE ANTİJENİK YAPI

Adenovirüsler 70-90 nm çapında, orta boyutlu, zarfsız, ikozahedral kapsidli virüslerdir. Her bir partikül 36 kb büyüklüğünde çift sarmallı lineer DNA içerir (10). Protein yapılı kapsidi 252 adet kapsomerden oluşmaktadır. Kapsomerlerin 240’ını yüzeyde yer alan hekzonlar, 12’sini ise köşelerde yer alan pentonlar oluşturur (6). Hekzonlar kapsidin toplam 20 adet olan eşkenar üçgen yüzeylerini oluştururken, pentonlar köşelerde yerleşmiş halde bulunur. Hekzonlar bütün insan adenovirüslerinde ortak olan antijenik yapıya sahiptir (10). Penton kapsomerleri ise tipe özgül antijeniteyi verir ve virüsün hücre kültüründe oluşturduğu erken sitopatik etkiden sorumludur. Pentonların her birinde birer adet penton bazı ve bu baza bağlı birer uzantı halinde fiber yapısı bulunur. Fiber antijeninin uzunluğu tiplere göre farklılık göstermektedir (18). Fiber ve penton bazı birlikte konak hücreleri ile viral kapsid arasındaki etkileşimden sorumludur (19).

Viral kapsidin çevrelemekte olduğu kor yapısı; viral DNA, polipeptid V, polipeptid VII, Mu polipeptidi ve terminal proteinden meydana gelmektedir (14). Viral DNA, yaklaşık 35-36 kilobaz uzunluğundadır ve 30 civarında virion ve virüse özgül protein kodlamaktadır (18). Adenovirüs serotip 2, 5 ve 7’nin tamamen, diğer serotiplerin ise kısmen DNA dizilim verileri mevcuttur. Viral DNA replikasyonu öncesinde genomun 5 farklı bölgesinden erken mRNA’lar sentezlenir. Bunlardan E1 proteini, enfeksiyonun başlaması ve gelişimi açısından çok önemlidir. Bir diğer erken viral protein olan E1A, viral genler ve bazı konakçı hücre genleri için transaktivatör görevi yapmaktadır. E1B, viral geç mRNA transportunu sağlamakta ve hücresel mRNA’nın sitoplazmaya ulaşmasını engellemektedir. E2A, replikasyon için gerekli olan DNA bağlayıcı bir proteindir. E2B ise DNA polimeraz sentezinden sorumludur. E3 erken proteinlerinin

makrofajlarda MHC polipeptidlerinin plazma zarına taşınmasını önlediği ve enfekte hücreleri TNF tarafından lizise karşı koruduğu gösterilmiştir. E4 erken proteinleri E1B proteinleri ile birlikte transformasyonda görev almaktadır (18).

Erken bölge transkripsiyon ürünlerinin belirgin olarak azalması ile eş zamanlı şekilde geç bölge proteinleri sentezlenmeye başlar. Sentezlenen geç proteinler (L1-L5) virüsün yapısal proteinleri olan hekzon, penton, fiber ve kor proteinleridir. Adenovirüsler replikasyon ve olgunlaşma için gereken RNA polimeraz ve nükleer faktör 3 gibi enzim ve proteinleri de kullanmaktadırlar (18).

2.4. ADENOVİRÜS'ÜN HÜCRE İÇİNE GİRİŞİ VE REPLİKASYONU

Adenovirüslerin dokulara tropizmi serotiplere ve serotiplerin bulunduğu türlere göre değişmektedir (Tablo 1) (19,20).

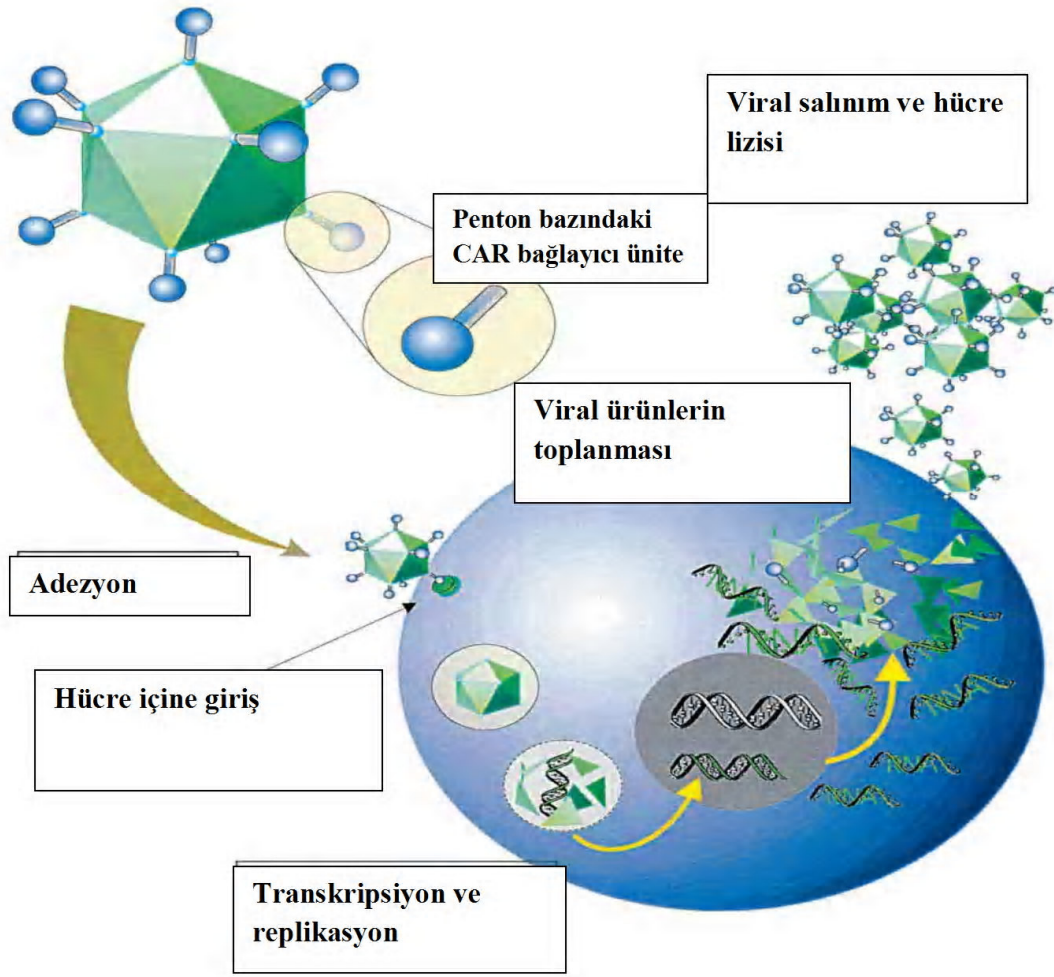
Adenovirüslerin B türü dışındaki diğer türleri, çeşitli organlarda bulunan coxsackie-adenovirüs reseptörlerini (CAR) kullanır (Şekil 1) (19). B cinsine ait serotipler ise CD46 reseptörlerini kullanmaktadır (13). Adenovirüslerin hücreye girişinde CAR ve CD46 dışında, CD80, CD86, integrinler, sialik asit ve heparan sülfat gibi proteoglikanların da rolü vardır (19,21). Virüs primer konak hücre reseptörüne yanaştıktan sonra; hücre yüzeyindeki integrinler ile virüsün penton bazı ilişkisi sayesinde, virüs partikülü hücrede endositik bir veziküle girer. Endozomun asidifikasyonu ile viral kapsid yapısında endozomal lizis ve virionların sitoplazma içine kaçmasıyla sonuçlanacak olan konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Daha sonra gerçekleşen kapsid soyulma süreci, enkapside viral proteazın aktivitesine dayanan bir süreçtir. Rezidüel virion vezikül içinden kaçtıktan sonra adenovirüs genomu mikrotübüller aracılığıyla hızlı bir şekilde nükleusa taşınır (13,19).

Tablo 1. Adenoviral hastalıklar, ilişkili serotipler ve konaklar (20)

HASTALIK	İLİŞKİLİ SEROTİPLER		
	Sık Görülen Serotipler	Sık Görülmeyen Serotipler	Sık Görüldüğü Konaklar
Üst Solunum Yolları Hastalığı	1-3,5,7	4,6,11,14,15,18,21,29,31	Yenidoğanlar, çocuklar
Alt Solunum Yolları Hastalığı	3,4,7,21	1,2,5,7,8,11,14,35	Yenidoğanlar, çocuklar, immüno-compromize bireyler
Boğmaca benzeri sendrom	5	1,2,3,12,19	Çocuklar
Akut Respiratuar Hastalık	4,7	2,3,5,8,11,14,21,35	Askeri birlikler
Akut Konjonktivit	1-4,7	6,9,10,11,15-17,19,20,22,37	Çocuklar
Akut Hemorajik Konjonktivit	11	2-8,14,15,19,37	Çocuklar
Faringokonjonktival Ateş	3,4,7	1,2,5,6,8,11-17,19-21,29,37	Çocuklar
Epidemik Keratokonjonktivit	8,9,37	2,3,4,5,7,10,11,13-17,19,21,23,29	Bütün yaş grupları
Gastroenterit	40,41	1,2,3,5,7,12-18,21,25,26,29,31,52	Çocuklar
Hemorajik Sistit	11	7,21,34,35	Çocuklar, immüno-supresif bireyler
Hepatit	1-3,5,7	4,31	Yenidoğanlar, çocuklar, immüno-supresif bireyler
Myokardit	7,21		Çocuklar
Meningoensefalit	7	1-3,5,6,11,12,26,32	Çocuklar, immüno-supresif bireyler
Cinsel Yolla Bulaşan Hastalık	2,37	1,4,5,7,9,11,18,19,31,49	Gençler, erişkinler
Dissemine Hastalık	1,2,5,11,34,35	3,6,7,14,21,29,31,32,37-39,43,45	İmmüno-supresif bireyler, yenidoğanlar

Viral DNA replikasyonu erken faz, gecikmiş erken faz ve geç faz olmak üzere üç fazda gerçekleşir (10). Erken fazda viral DNA replikasyonu, geç fazda ise viral kapsidin yapısal proteinlerinin ekspresyonu gerçekleşir. Enfeksiyondan kısa bir süre sonra erken viral transkripsiyon üniteleri olan E1A, E1B, E2A, E2B, E3 ve E4 üniteleri aktive olur (19). E1A ve E1B, enfekte hücreyi adenovirüs genlerinin replikasyonu ve transkripsiyonu yönünde uyarır. E1A, IFN ile indüklenmiş gen ekspresyonunu ve p53 ve Rb gibi tümör supressor genlerin fonksiyonlarını bloke etmektedir. E1B proteinleri ise uyarılmış olan hücrede apoptozu inhibe eder (10). Enfeksiyondan yaklaşık 7 saat sonra E2 gen ürünleri ortaya çıkar ve konak hücre ölünceye kadar sürecek olan viral DNA sentez aşaması başlar (19).

Adenovirüs genomu DNA replikasyonu için gereken DNA bağlayıcı protein (DBP), prekürsör terminal protein (pTP) ve DNA polimeraz, nükleer faktör I,II ve III gibi hücresel proteinleri kodlar (19). DNA replikasyonu asimetric özelliktedir ve tek iplikçiğin 3' ucundan başlar. DNA sonunda bulunan tekrarlayan diziler sayesinde replikasyon sırasında tek iplikli çembersel DNA oluşur. Çembersel tek iplikli DNA daha sonra sentez sırasında açılarak çift iplikli DNA haline gelir (18). DNA replikasyonu başladıktan sonra adenovirüs majör geç promoter (MLP) aktivasyonu ile geç faz genleri eksprese olur. Bu genler viral yapısal proteinleri, virüs partiküllerinin olgunlaşmaları ve enkapsidasyonu için gereken proteinleri kodlamaktadır. Virionlar enfekte hücrenin nükleusunda nükleer inklüzyon cisimciklerine benzer şekilde agregatlar halinde toplanırlar. Replikasyon siklusu yaklaşık 30 saat sürmektedir. Her bir enfekte hücrede 10 000-1 000 000 adet viral partikül üretilir, ancak bunların % 1-5'i enfeksiyöz özelliktedir. Enfeksiyonu takiben 3 gün içinde de hücre lizisi ile serbest kalırlar (10,19).



Şekil 1. Adenovirüslerin hücre içine girişi ve replikasyonu (22)

2.5. FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKİLERE DİRENÇ

Adenovirüsler çevresel etkenlere yüksek düzeyde dirençlidir ve genel olarak kullanılmakta olan birçok dezenfektan solüsyonu içinde canlı kalabilirler. Oda sıcaklığında haftalarca enfeksiyöz özelliklerini korumakta ve bu nedenle nosokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır (5). Herhangi bir şekilde adenovirüs kaynaklı nosokomiyal enfeksiyondan şüphelenildiğinde en kısa sürede tanının doğrulanması ve korunma önlemlerinin alınması gerekmektedir. Her ne kadar sıkı enfeksiyon kontrol önlemleri alınsa da adenoviral konjonktivit genellikle ciddi nosokomiyal salgınlara yol açmaktadır (23). Nosokomiyal enfeksiyonlar dışında adenovirüsler nehirler, kıyı bölgeleri, yüzme havuzları ve içme sularında da bulunmaktadır. Adenovirüslerin UV ile dezenfeksiyona diğer enterik virüslerden daha dirençli oldukları gösterilmiştir (24).

Pürifikasyon ve dezenfeksiyon işlemlerine dirençli olmaları, virüs DNA'sının çift iplikli yapısı ile ilişkili olabilir. Viral DNA'nın çift ipliklerinden herhangi biri çevresel faktörler nedeni ile hasarlanırsa, diğer iplik replikasyonda kalıp görevi üstlenir (25). Sodyum hipoklorit (500ppm) ile 10 dakikada, % 70 etanol ile en az bir dakikada, sıcak su banyosunda 75° C'de 30 saniyede inaktive olurlar (6,10). Yüzey dezenfeksiyonu için % 70 etanol, % 65 etanol ve % 0,63 kuarterner amonyum türevleri içeren solüsyonlarla en az bir dakika temas sağlanmalıdır (10).

2.6. PATOLOJİ VE PATOGENEZ

Adenovirüsler mukoza epiteli ve lenfoid hücrelere tropizm göstermektedir (26). Özellikle göz, solunum, intestinal ve genitoüriner sistem organlarının yüzeyel hücrelerini enfekte ederler (18). Gözü tutan adenoviral enfeksiyonlarda inflamatuvar membran, konjonktival hemoraji, konjonktival ödem ve foliküler reaksiyon görülebilmektedir (27). Enfekte olmuş hücre çekirdeğinde yoğun intranükleer inklüzyonlar görülür ancak hücrede büyüme görülmez. Enfeksiyon bölgesinde mononükleer hücre infiltrasyonu ve epitelyal nekroz görülebilmektedir (18).

2.7. KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Adenovirüsler başlıca göz, solunum sistemi, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistemde enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bunların dışında özellikle immünsupressif hastalarda hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (7). Enfeksiyonun kliniği konağa ve etken olan serotipe göre değişmektedir (10,28).

2.7.1. Göz Enfeksiyonları

Adenoviral göz enfeksiyonlarında bulaş genellikle damlacık yolu ve direkt temas yolu ile olmaktadır. Özellikle hastane gibi sağlık bakım alanlarında kontamine araç gereçlerin kullanımı ile salgınlar görülmektedir (29). Adenoviral göz enfeksiyonları klinik olarak foliküler konjonktivit, faringokonjonktival ateş ve epidemik keratokonjonktivit şeklinde görülmektedir (4,30).

Klinik oftalmolojide adenoviral konjonktivit çok sık rastlanan bir durumdur (31). Toplum kökenli ve nozokomiyal viral konjonktivit salgınlarının en sık görülen etkenidir (32). Konjonktivit etkeni olarak öne çıkan serotipler AdV 1-11, 15, 16, 17, 19, 20 ve 22 serotipleridir (3). Enfeksiyon kontamine olmuş eller, medikal araçlar ve yüzme

havuzları aracılığıyla okullar, işyerleri, hastaneler gibi kalabalık yerlerden bulaşarak geniş çaplı salgınlara neden olur (33). Genellikle tek taraflı olarak başlayıp birkaç gün içinde çift taraflı hale gelir. Gözde yabancı cisim hissi, fotofobi, konjonktival lenfoid dokuda foliküler reaksiyon görülür. Şiddetli vakalarda konjonktival hemoraji ve fibrin pseudomembranlar oluşabilir (31). Göz bulgularına preaurikular lenfadenopati eklenebilir. Hastalık genellikle 3-5 gün sürer, kendini sınırlar ve görme etkilenmez (30,31). Yaklaşık iki hafta boyunca bulaştırıcılık devam eder (34).

Adenoviral göz enfeksiyonlarının bir diğer formu olan faringokonjonktival ateş, bilateral foliküler konjonktivit, rinit, ani başlangıçlı ateş ve farenjit ile karakterizedir (33,35). Daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde sporadik olarak veya salgınlar halinde ortaya çıkar (33). Hastalık genellikle 5-7 gün sürer ve kendiliğinden düzelir. Bazen semptomlar iki hafta kadar sürebilmektedir (30,34). Adenovirüs serotip 3 ve 7 başta olmak üzere 1-7, 11-17, 19 ve 21 faringokonjonktival ateş etkenlerindendir (10).

Epidemik keratokonjonktivit, faringokonjonktival ateşin aksine son derece bulaşıcı ve şiddetli bir enfeksiyondur (10). AdV serotip 4, 8, 19 ve 37 başta olmak üzere serotip 53, 54 ve 56'yı da kapsayan birçok serotip epidemik keratokonjonktivit etkeni olarak gösterilmiştir (8,36). Foliküler konjonktivitte gözlenen diğer konjonktival semptomlara ek olarak ödem, küçük peteşiyal hemorajiler ve inflamatuvar pseudomembranların oluşumu epidemik keratokonjonktivit için karakteristiktir (33). Korneal tutulumla beraber yüzeysel korneal erozyon, daha derinde karakteristik şekilli subepitelyal korneal infiltratlar gözlenir. Hastalık ilk defa 1941 yılında gemi tersaneleri çalışanlarında tanımlandığı için 'tersane gözü' olarak adlandırılmıştır. İnkübasyon süresi 4-10 gündür. Konjonktivit iki haftada geçse bile görmede azalma, fotofobi, ağrı ve gözde yabancı cisim hissi aylarca hatta yıllarca devam edebilmektedir (10). Dünya genelinde özellikle toplu bulunan yerlerde epidemik keratokonjonktivit salgınlara sıkça rastlanmaktadır (5,10).

2.7.2. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Adenovirüslerin solunum sistemi enfeksiyonları alt ve üst solunum yollarında görülmekte olup farenjit, tonsillit, laringotrakeobronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi farklı klinik formlarda olabilmektedir (37). Üst solunum yolu enfeksiyonları genellikle C türüne ait serotipler ile oluşurken, alt solunum yolu enfeksiyonları özellikle

çocuklarda B türü serotipleri ile oluşmaktadır (10). Adenoviral solunum yolu enfeksiyonları genel olarak yıl boyu görülmekte ancak kış ve ilkbahar mevsimlerinde pik yapmaktadır (10,38).

Akut respiratuvar enfeksiyonlar genellikle küçük çocuklarda görülür, beş yaşına kadar geçirilen akut respiratuvar enfeksiyonların yaklaşık % 5'i adenovirüslere bağlıdır (17). Bu enfeksiyonlar genellikle serotip 1, 2 ve 5'e bağlı olup genellikle kendi kendini sınırlar (24). Adenoviral pnömoni genellikle AdV 3, 4, 7, 14 ve 21 serotipleri ile ortaya çıkmakta olup özellikle okullar, askeri birlikler gibi kalabalık yerlerde salgınlara neden olmaktadır (10).

Bunların dışında, AdV serotip 5 boğmaca-benzeri sendrom etkeni olarak izole edilmiştir. Boğmaca etkeni olan *B.pertussis* ile enfekte olan hastalarda AdV 5 bulunma oranı çok yüksek bulunmuştur. Ancak bunun bir koenfeksiyon sonucu veya boğmaca hastalığının latent haldeki adenovirüslerin reaktivasyonu için uygun şartlar oluşturması sonucunda gelişip gelişmediği bilinmemektedir (10).

2.7.3. Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları

Adenovirüsler pediatrik popülasyonda akut hemorajik sistit etkenidirler. Ani başlangıçlı hematüri, dizüri ve sık idrara çıkma ile karakterize olan bu enfeksiyonun en sık görülen etkenleri serotip 11, 34 ve 35'tir. İmmüsupressif hastalarda adenovirüsler böbrekte persistan enfeksiyonlara neden olarak ara ara reaktif olmaktadır (10).

2.7.4. Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

Adenovirüsler iki yaş altı çocuklarda viral gastroenteritlerin en sık görülen ikinci etkenidir. Fekal-oral yolla bulaş görülür. Adenoviral gastroenterit yıl boyu görülebilmekte olup, insidansı % 4-12 arasında değişmektedir. En sık etken olan serotipleri AdV 40 ve 41'dir. Diyare genellikle bol sulu, kansız özelliktedir ve lökosit içermez. Hafif ateş, karın ağrısı ve kusma eşlik edebilir. Semptomlar ortalama 10 gün kadar sürer. Adenoviral gastroenteriti takiben bazı hastalarda 5-7 aya kadar uzayabilen laktoz intoleransı gelişebilmektedir. Adenovirüsler gastroenterit dışında intususepsiyon, akut mezenterik lenfadenit ve apandisit de neden olabilmektedir (10).

2.8. LABORATUVAR TANI

2.8.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bütün viral enfeksiyonlarda olduğu gibi adenovirüs enfeksiyonlarında da optimal tanı için hastalığın erken döneminde örnek alınmalıdır. Balgam, boğaz yıkama suyu, nazofaringeal aspirat, konjonktival sürüntü, idrar, BOS, kan ve çeşitli biyopsi örnekleri tanıda kullanılabilir. Semptomların ortaya çıkmasından itibaren virüs salınımı solunum yolu enfeksiyonlarında ortalama bir hafta, göz enfeksiyonlarında ortalama iki hafta sürmektedir (10).

Konjonktival sürüntü örnekleri alt palpebral konjonktivadan elde edilmektedir (39). Adenovirüsler hücre nükleusunda replike oldukları için sürüntü alınırken mümkün olduğu kadar fazla konjonktival hücre alınması önemli bir noktadır (40). Sürüntü örnekleri mutlaka serum, antibiyotik, antimikotik, albümin veya jelatin içeren viral transport besiyeri içinde taşınmalıdır. Adenovirüsler stabil virüslerdir ve oda sıcaklığında taşınabilir ancak buna rağmen laboratuvara en kısa sürede gönderilmesi tavsiye edilmektedir (10). İdeal olarak transport süresi 4 saati geçmemelidir (38).

Eğer hücre kültürü yapılacaksa örnekler viral transport besiyeri içinde kültür işlemi yapılana kadar soğuk ortamda saklanmalıdır. Sıcaklık aniden değil, kademeli bir şekilde düşürülmelidir. Eğer örnekler 24 saatten daha kısa bir sürede işleme alınacaksa +4°C’de saklamak en iyi yöntemdir. Ancak örnekler daha uzun süre bekleyecekse -70°C’de muhafaza edilmelidir (41).

Adenovirüs enfeksiyonlarının özgül tanısında;

1. Direkt inceleme,

- Viral partikül tayini
- Antijen tayini
- Moleküler yöntemler

2. Virüs izolasyonu,

3. Serolojik yöntemler,

4. Tiplendirme testleri kullanılmaktadır (10,20).

2.8.2. Direkt İnceleme

2.8.2.1. Viral Partikül Tayini

Virüs partikülünün gösterilmesi amacıyla kullanılan elektron mikroskopi (EM) yöntemi pratikte kullanımı sınırlı, zahmetli ve pahalı bir yöntemdir (42). Bu yöntem daha çok viral partiküllerin daha yüksek oranda (10^5 - 10^6 partikül/mL) bulunduğu adenoviral akut gastroenterit olgularında daha kullanışlıdır (10,42). Elektron mikroskopi günümüzde rutin tanıdan çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır (6,43). Bu yöntem immün elektron mikroskopi (IEM) teknikleri ile kombine edilirse duyarlılık oranı artar (44).

2.8.2.2. Antijen Tayini

Viral antijen tayininde en sık kullanılan testler enzyime immunoassay (EIA) ve immünfloresan (IF) testleridir (43). Adenoviral göz enfeksiyonlarında son zamanlarda kullanıma girmiş olan bir diğer antijen belirleyici test ise immünokromatografi (IC) yöntemidir (23).

EIA yöntemi daha çok enterik adenovirüslerin tanısında kullanılmakta olan bir yöntemdir ancak göz enfeksiyonlarında duyarlılığı % 65-75 gibi düşük oranlardadır (10).

IF yönteminde genellikle hekzon proteinlerine karşı monoklonal antikorlar kullanılır. Özellikle solunum yolu, sürüntü ve biyopsi örneklerinde kullanışlıdır. Bu yöntemin avantajı hızlı olmasıdır ancak hücre kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılığı % 30-60 olarak bulunmuştur (10). Ayrıca değerlendirme aşaması kişiye bağlıdır (43).

IC yöntemi, örneğin membran bir strip boyunca lateral olarak ilerlediği, antijenin virüse spesifik antikorlara bağlanarak birkaç dakika içinde renkli bir çizginin görüldüğü hızlı bir tanı yöntemidir (10). Yöntemin duyarlılığı % 60-70 gibi düşük oranlardadır (45).

Adenoviral antijen arayan ticari hızlı testler her ne kadar pratik kullanımda kolay ve hızlı olsa da, nükleik asit belirleyen testler ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllükleri daha düşüktür (5).

2.8.2.3. Moleküler Yöntemler

Adenovirüslere bağlı göz enfeksiyonları kolaylıkla salgınlara yol açarak ekonomik kayıplara neden olurlar. Bu nedenle hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır (40). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi hızlı sonuç veren ve yüksek duyarlılığa sahip moleküler yöntemler günümüzde sık olarak tercih edilmektedir (27).

Amplifikasyonlu veya amplifikasyonsuz moleküler tanı yöntemleri ile DNA belirlenmesi mümkündür. Amplifikasyonsuz hibridizasyon teknikleri düşük duyarlılık oranlarıyla bilinmektedir (10). Son yıllarda PCR yoluyla DNA amplifikasyonu kullanan moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi, artmış duyarlılık ve hızlı tanıyı sağlamaktadır. Adenoviral enfeksiyonların tanısında temel olarak konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri uygulanmaktadır. Her iki yöntemde de serotipler arasında yüksek oranda korunmuş olan hekson geni, fiber geni, viral ilişkili RNA I ve RNA II bölgelerinden primerler kullanılmaktadır (6).

Konvansiyonel PCR kalitatif bir yöntemdir ve sonuçlar 1-2 gün içinde elde edilir. Real-time PCR ise amplifiye olmuş ürünlerin en kısa sürede belirlenebildiği, saatler içinde sonuç alınabilen, kantitatif sonuç verebilen bir yöntem olması açısından daha avantajlıdır (6,10).

2.8.3. Virüs İzolasyonu

Adenoviral göz enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında altın standart yöntem hücre kültürüdür (40). Enterik adenovirüsler dışında bütün adenovirüsler primer insan embriyonik böbrek hücre kültürü (HEK), epitelyal orijinli devamlı hücre kültürleri olan insan servikal kanser hücre kültürü (HeLa), insan epidermoid karsinom hücre kültürü (HEp-2) hücrelerinde replike olurlar (18). Virüsler hücre kültüründe ürediklerinde hücrelerde sitopatik etki (CPE) olarak adlandırılan morfolojik değişiklikler yaparlar (43). Adenovirüslerin sitopatik etkisi hücrelerin yuvarlaklaşıp bir araya toplanması ile üzüm salkımına benzer bir görünüm olan agregasyon şeklinde olmaktadır (46). Hücre kültüründe sitopatik etki 2-28 gün içinde görünür hale gelmektedir. Sitopatik etki oluşumu monoklonal antihekson antikörlerle floresan boyama, radioimmünoasay (RIA), elektron mikroskopi, nötralizasyon veya ELISA gibi yöntemlerle doğrulanmalıdır (10,47).

Son zamanlarda shell-vial yöntemiyle yapılan hızlı hücre kültürü yöntemi giderek artan bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde virüs izolasyonu 24-72 saat gibi kısa sürede belirlenmektedir (11). Hücre kültürleri shell-vial tüplerde bulunan lamellerin üzerinde hazırlanır. Shell-vial hücre kültürüne ekim yapılırken, virüsün hücre içine girişini hızlandırmak ve üreme süresini kısaltmak amacıyla santrifüj işlemi uygulanır. Lameller yaklaşık 24-48 saat sonra etkene özgül FITC ile işaretli monoklonal antikorla boyanır (46). Böylece sitopatik etki oluşması beklenmeden hücre içindeki erken viral proteinler saptanmış olur (42). Shell-vial yöntemi, konvansiyonel hücre kültürü yöntemlerine göre daha kısa sürede pozitif sonuç vermektedir (27). Ayrıca adenovirüslerin laboratuvar tanısında shell-vial yönteminin duyarlılığı konvansiyonel hücre kültürleri ile aynıdır (11).

2.8.4. Serolojik Yöntemler

Adenovirüs enfeksiyonlarının tanısında spesifik IgM veya IgG varlığının gösterilmesinde EIA, IF, hemagglütinasyon inhibisyon (HAI), nötralizasyon ve kompleman birleşme deneyi (KBD) yöntemleri uygulanmaktadır (10,18). KBD gruba özgül antikorları saptar ancak serotipe özgül değildir. Ayrıca duyarlılığı düşük olmakla beraber adenovirüslerin herhangi bir serotipi ile oluşan enfeksiyonda, akut ve konvelesan dönemler arasında antikor titresinde en az dört kat artış anlamlıdır. Nötralizasyon ve HAI testleri ise serotipe özgül sonuç verir (47).

Serolojik yöntemlerde; spesifik IgM'nin enfeksiyonların % 20-50'sinde görülmesi, zayıf immün cevap durumunda yanlış negatif sonuçların tespit edilebilmesi, yanlış pozitif sonuçların saptanabilmesi ve serokonversiyon tabanlı testlerin retrospektif tanı sağlaması gibi çeşitli sınırlamalar mevcuttur. Ancak serolojik testler epidemiyolojik çalışmalar açısından önemini korumaktadır (10).

2.8.5. Tiplendirme

Adenovirüslerin tiplendirilmesi daha çok epidemiyolojik araştırmalarda, patogenezi çalışmalarında, sık rastlanmayan ciddi enfeksiyonların etkeninin araştırılmasında kullanılmaktadır. Tiplendirme serolojik veya moleküler yöntemlerle yapılır (10).

Adenovirüsün tiplendirilmesinde serolojik yöntemler nötralizasyon, hemagglütinasyon ve hemagglütinasyon inhibisyon testleri uygulanmaktadır. Bunlar içinde nötralizasyon testinin tanımlayıcılığı daha yüksektir (6,10).

Moleküler tiplendirmede restriksiyon enzim analizi (REA), DNA dizi analizi, “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) ya da “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) gibi yöntemler uygulanmaktadır. Son zamanlarda PCR ile tiplendirme birçok laboratuvarında tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (6,10).

2.9. EPİDEMİYOLOJİ

Adenovirüs enfeksiyonları direkt temas, damlacık yolu, fekal-oral yol, yüzme havuzları, oküler enstrümanlar ve ortak kullanılan eşyalar yoluyla bulaşmaktadır (10). Özellikle yüzme havuzlarından kaynaklanan enfeksiyonlarda en sık görülen etken adenovirüslerdir (35). Göz enfeksiyonları çok bulaşıcıdır ve okullar, askeri birlikler ve oftalmoloji klinikleri gibi kalabalık bulunan yerlerde sıklıkla görülürler (19). Enfeksiyon çok hafif formdan ciddi hastalığa kadar değişen görünümde olabilir. Asemptomatik enfekte hastalar ve hastane çalışanları farkında olmadan virüsü bulaştırabilmektedir (48). Bu şekilde dünya genelinde epidemik salgınlar görülmekte ve bu durum hastanelerde bazı bölümlerin kapatılmasına kadar gidebilmektedir (5). Bundan dolayı adenovirüs salgınları ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (19).

Adenovirüs enfeksiyonları genellikle yıl boyu görülür ancak yüzme havuzlu kaynaklı konjonktivit yaz aylarında pik yapar (47).

Adenovirüs serotipleri doku tropizmi göstermektedir. Serotip 2-4, 6-8, 19 ve 37 sıklıkla konjonktivit ve keratokonjonktivit olgularından izole edilmiştir (49).

Adenovirüs enfeksiyonları epidemiler dışında sadece klinik kriterler ile belirlenemediği için, genel epidemiyolojik çalışmalarda virüsün saptanmasına veya serolojik kanıtlara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu enfeksiyonların bildirimi zorunlu olmadığından henüz ulusal mortalite ve morbiditeyi içeren veriler mevcut değildir (18,31,50).

2.10. KORUNMA

Bütün enfeksiyonlarda olduğu gibi adenoviral enfeksiyonlarda da el yıkama en başta gelen korunma önlemidir. Kontamine olduğu düşünülen yüzeyler sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmelidir. Kalabalık yaşanan yerlerde kontamine havlularla salgınlar olabildiği için tek kullanımlık kağıt havluların kullanımı tavsiye edilmektedir. Su kaynaklı enfeksiyonlarda yüzme havuzlarının yeterli klorlanması gerekmektedir (47).

Salgınların önlenmesinde adenoviral konjonktivit tanısının hızlı ve doğru tanısı çok önemlidir. Enfeksiyondan şüphelenilen herhangi bir hasta görülmesi halinde; oftalmolog tanıyı doğruladıktan sonra nozokomiyal enfeksiyonu önlemek için el yıkama, enstrümanların sterilizasyonu, yüzeylerin dezenfeksiyonu ve hastaların izolasyonu gibi kontrol önlemlerinin alınmasını sağlamalıdır. Hastanın birlikte yaşadığı kişilerin izolasyonu da dahil olmak üzere kişisel hijyen önlemleri alınmalıdır. Aynı zamanda hastanın işe/okula gitmemesi sağlanmalı ve bu süre gerektiğinde iki haftaya kadar uzatılabilir (38). Bütün önlemlere rağmen adenoviral konjonktivit, kliniklerin kapanmasına kadar varan ciddi nozokomiyal salgınlara neden olmaktadır (23,48).

Amerika Birleşik Devletleri'nde askeri birliklerde adenovirüslere bağlı solunum sistemi enfeksiyonlardan korunma amacıyla serotip 4 ve 7'yi içeren canlı aşılar kullanılmıştır. Ancak 1999 yılından sonra üretici firma aşı üretimine son vermiştir (47).

2.11. TEDAVİ

Adenovirüs enfeksiyonlarının spesifik tedavisi yoktur (47). Ribavirin ve sidofovir ile yapılmış olan küçük çaplı çalışmalar mevcuttur ancak değişken sonuçlar bulunmaktadır (19). Sidofovir antiviral ilaçlar içinde en güçlü etkiye sahiptir. Ribavirin ve gansiklovir ise daha az etkili bulunmuştur (10).

Ribavirin geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. Hücre membranını geçerek hücre içinde fosforile olur, inozin monofosfat dehidrogenazı inhibe eder. Adenoviral göz enfeksiyonlarında topikal kullanımı hakkında yeterli etkinliği bulunamamış olup, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (30). Sidofovir viral DNA polimerazı inhibe eden bir sitozin monofosfat analogudur. Sidofovir daha çok sistemik adenoviral enfeksiyonlarda çalışılmış olup günümüzde bazı hastanelerde özellikle immünsupresif hastaların preemptif tedavilerinde kullanılmaktadır. İntravenöz immünglobülinlerin kullanımı söz konusu olsa da bu konuda sınırlı veri bulunmaktadır (10).

Klinik pratikte halen adenoviral konjonktivitli hastalarda antiviral tedavi bulunmamaktadır (31). Akut dönemde steroidler, suni gözyaşı damlaları ve bazı olgularda süperenfeksiyonu önlemek amacıyla antibiyotikli damlalar gibi semptomatik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. ÖRNEKLER

Mart 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniğine konjonktivit ön tanısı ile başvuran ve adenoviral konjonktivit düşünülen 50 hastadan alınan konjonktival sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Adenoviral konjonktivit ön tanılı hastaların gözlerinin alt palpebral konjonktiva bölgesinden ikişer adet plastik saplı dakron eküvyon ile sürüntü örneği alınarak viral transport besiyeri (Vircell, Spain) içerisine konuldu. Viral transport besiyerlerinden biri PCR, diğeri hücre kültüründe kullanılmak üzere -70°C’de muhafaza edildi.

3.2. ADENOVİRÜS DNA’NIN PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Bütün örneklerde nükleik asit izolasyonu EZ1 Virus Mini Kiti v2.0 (Qiagen, Almanya) kullanılarak test kitin prosedürüne uygun olarak çalışıldı. *Adenovirus* DNA amplifikasyonu için Realstar Adenovirus PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics, Qiagen, Almanya) kiti ile PCR işlemi uygulandı.

Nükleik asit izolasyonu

Örnekler çalışmadan önce 15-25°C oda sıcaklığına getirildi.

Kit içeriği (EZ1 Virus Mini Kiti v2.0 (Qiagen, Almanya))

- Buffer AVE (3 adet)
- Carrier RNA (1 adet)
- İzolasyon kiti (48 adet)
- Reagent cartridges virüs mini v2.0 (8 adet)
- Sample tüp, conical 2 mL (100 adet)
- 1,5 mL tüp (100 adet)
- Disposable pipet ucu (50 adet)
- Disposable tip holders (50 adet)

Sürüntü örneklerine uygulanan nükleik asit izolasyon prosedürü

1. Transport besiyeri içinde bulunan sürüntü örnekleri vortekslendi, 400'er µL alınıp ependrof tüplere konuldu.
2. Her örnek için 3,8 µL Carrier RNA, 7,2 µL internal kontrol ve 49 µL buffer AVE'den oluşan karışım hazırlandı ve 1,5 ml'lik tüplere konuldu.
3. İzolasyon cihazı EZ 1 Advanced (Qiagen, Almanya) içine izolasyon işlemi için gerekli solüsyonlar yerleştirildi.
4. Cihaz prosedürü seçilerek izolasyon işlemi başlatıldı.
5. İzolasyon işlemi sonunda izolatlar alınarak numaralandırıldı.
6. Hasta örnekleriyle birlikte negatif kontrol olarak deiyonize sudan nükleik asit izolasyonu yapıldı.
7. Ependrof tüplerinde bulunan izolatlar nükleik asit PCR çalışması için çalışmaya alınana kadar en fazla iki gün -20°C'de saklandı.

Adenovirüs DNA Amplifikasyonu

Bütün örneklerle *Adenovirus* DNA belirlenmesi için Rotor-Gene Q5 plex (Qiagen, Almanya) cihazında PCR işlemi uygulandı.

Kit İçeriği (Realstar Adenovirus PCR Kit 1.0, Altona Diagnostics, Qiagen, Almanya)

- Master A (4 adet)
 - Master B (4 adet)
 - Internal kontrol (1 adet)
 - Steril distile su (1 adet)
 - Standartlar S₁, S₂, S₃, S₄
- PCR kitinde hedef bölge 'hekzon geni'dir.

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden % 10'luk hipokloritli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminar akımlı kabin içerisinde çalışıldı.
2. Amplifikasyon için kullanılacak kit +4°C'den çıkarıldı.
3. Hasta başına Master A'dan 2,5 µL, Master B'den 7,5 µL hesaplanarak PCR-miks hazırlandı.
4. PCR-miks karışımından her bir tüpe 0,1 µL dağıtıldı.
5. Her bir tüpe sırayla numaralandırılmış DNA izolatlarından 5'er µL dağıtıldı.
6. Standartlar S₁, S₂, S₃, S₄ olarak 10'ar µL dağıtıldı.
7. Negatif kontrol tüpüne deiyonize sudan elde edilen DNA izolatu eklendi.
8. Tüplerin kapaklarına hasta numaraları ve kontrollerin isimleri sırasıyla yazıldı.

9. Tüpler Rotor-Gene Q5 plex (Qiagen, Almanya) cihazına yerleştirilip PCR programı başlatıldı. PCR programı aşağıdaki gibidir:

95 °C’de bekleme	10 dakika
95 °C’de 10 dakika	
95 °C’de 15 saniye	} 42 siklus
58 °C’de 60 saniye	
+4 °C’de	∞

10. Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri cihazın içinden alındı.

11. Değerlendirme aşamasında her bir hastanın hedef bölge ve internal kontrol eğrileri kıyaslandı. Threshold çizgisi üzerinde kalan eğriler pozitif olarak kabul edildi ve örneklerin viral yükleri değerlendirildi.

3.3. ADENOVİRÜS’ÜN KONVANSİYONEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU

Adenovirüs izolasyonunda HEp-2 hücreleri kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarının bütün aşamaları önceden % 70’lik alkolle silinmiş ve ultraviyole ışınlarına maruz bırakılmış laminar akımlı kabinde yapıldı. Bütün örneklerden HEp-2 hücre kültürüne ekim yapıldı ve 37°C’de % 5 CO₂’li etüvde inkübe edildi. Hücreler invert mikroskopla incelendi.

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar:

1. Hanks’ dengeli tuz solüsyonu

• Hanks’ solüsyonu (Gibco, 10X)	10 mL
• Steril deiyonize su	90 mL
• %4,4’lük NaHCO ₃	1 mL

2. Gelişme besiyeri

• RPMI 1640 besiyeri (Lonza)	10 mL
• Steril deiyonize su	90 mL
• %4,4'lük NaHCO ₃	3,5 mL
• 200 mM L-glutamin (Biological Industries)	1 mL
• Fetal bovine serum (56°C'de 30 dakikada inaktive edilmiş)	10 mL
• 10 000 U/mL penisilin stok solüsyonu	1 mL
• 10 000 U/mL streptomisin stok solüsyonu	1 mL
• 5 mg. amfoterisin B stok solüsyonu	1 mL

3. Stok solüsyonların hazırlanışı

PENİSİLİN STOK SOLÜSYONU: Bir şişe penisilin (1 000 000 ünite) 1 mL deiyonize su ile sulandırıldı, 100 kez dilüe edildikten sonra birer mL olacak şekilde ependroflara bölünerek saklandı.

STREPTOMİSİN STOK SOLÜSYONU: Bir şişe streptomisin (1gr) 1 mL deiyonize su ile sulandırıldı, 100 kez dilüe edildikten sonra birer mL olacak şekilde ependroflara bölünerek saklandı.

AMFOTERİSİN B STOK SOLÜSYONU: Bir şişe amfoterisin B (50 mg) 10 mL deiyonize su ile 10 kez dilüe edildi. Bu solüsyondan 0,3 mL ayrıldı. Daha önceden hazırlanmış olan %4,4'lük NaHCO₃ solüsyonundan 1,47 mL alınarak 13,23 mL Hanks' solüsyonu ile karıştırıldı. Toplamda 14,7 mL solüsyon elde edildi. En son olarak 0,3 mL amfoterisin B solüsyonu ile 14,7 mL Hanks' ve NaHCO₃ solüsyonu karıştırılarak 15 mL final solüsyon elde edildikten sonra birer mL olacak şekilde ependroflara bölünerek saklandı.

• Penisilin, streptomisin ve amfoterisin B solüsyonları 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

4. Devam besiyeri

Gelişme besiyeri hazırlanırken kullanılan solüsyonlar ve miktarları aynı şekilde kullanıldı ancak fetal bovine serumu 2 mL olarak eklendi.

5. Sodyum Bikarbonat Hazırlanması

4,4 gr. NaHCO_3 100 mL deiyonize su içinde çözünerek otoklavda steril edildi ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

6. Tripsin Hazırlanması

2,5 gr tripsin (Biological Industries) 100 mL Hanks' solüsyonu içine eklenip manyetik karıştırıcıda bir saat karıştırıldı. pH 7.4 olacak şekilde sodyum bikarbonat ile ayarlandı. 0.22 μm filtreden geçirilerek steril edildi. 1 mL'lik eşit hacimlerde ependrof tüplere bölünerek -20°C 'de saklandı.

7. L-Glutamin Hazırlanması

1,46 gr L-glutamin (Biological Industries) 10 mL deiyonize suda eritildi. Bu karışımdan 1 mL alınarak 4 mL deiyonize su eklendi ve 200 nM'lık L-glutamin çözeltisi elde edildi. 0.22 μm filtreden geçirilerek steril edildi. 1 mL'lik eşit hacimlerde ependrof tüplere bölünerek -20°C 'de saklandı.

Kullanılan cihazlar:

1. CO_2 'li etüv
2. Class 2A laminar akımlı kabin
3. Santrifüj
4. Benmari
5. İnvert mikroskop

Hücre Kültürü

HEp-2 Hücrelerinin Pasaj Edilmesi

1. Tam tabaka teşkil etmiş olan hücre kültür şişesindeki (75cm²) besiyeri alındı.
2. Kültür şişesi üzerine 10 mL Hanks' dengeli tuz solüsyonu eklenerek hücreler yıkandı. Hanks' dengeli tuz solüsyonu döküldü.
3. Hanks' dengeli tuz solüsyonundan 10 mL alınarak içerisine 1 mL tripsin eklendikten sonra elde edilen solüsyon şişe üzerine eklendi. Birkaç dakika bekletildikten sonra karışım döküldü.
4. Şişeler 37°C'de 5-10 dakika bekletilerek hücrelerin şişenin yüzeyinden ayrılması sağlandı.
5. Hücreler şişenin yüzeyinden ayrılıp hareket etmeye başlayınca üzerine 10 mL gelişme besiyeri konuldu. Hücrelerin kümeleşmesini önlemek için iyice pipetaj yapıldıktan sonra, iki adet boş hücre kültür şişesine eşit olarak dağıtıldı.
6. Yeni hazırlanan hücre kültürü şişeleri üzerine şişe hacminin % 10'unu tamamlayacak kadar (yaklaşık 20-25 mL) gelişme besiyeri konuldu ve pipetaj yapıldı.
7. Tripsin uygulanan hücre kültürü şişesi üzerine 25-30 mL kadar gelişme besiyeri eklendi.
8. Hücre kültürü şişeleri % 5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edildi.
9. Hücreler hücre kültürü şişelerinin yüzeyini tek tabaka halinde tamamen kaplayana kadar, besiyeri 24-48 saatte bir gelişme besiyeri ile değiştirildi.

Hücrelerin Dondurulması

1. Hücreler üzerindeki besiyeri alınarak yukarıda anlatıldığı şekilde pasaj işlemlerinde yapıldığı gibi tripsin ile muamele edildi.
2. Hücreler santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi.

3. Üstteki süpernatant atıldı. Hücre pelleti üzerine 1 mL gelişme besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu hücre süspansiyonunun üzerine 1 mL fetal bovine serum eklendi, pipetaj yapıldı ve mL'de 1×10^6 hücre olacak şekilde ticari saklama tüpüne (kriyotüp) eklendi.
4. Hazırlanan hücre karışımı üzerine, toplam hücre süspansiyonunun %10'u kadar dimetilsülfoksit konuldu ve pipetaj yapıldı.
5. Hücreler +4 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra -20 °C'de 1 saat ve takiben -70 °C'de bir gece tutulduktan sonra kriyotüpler alınıp sıvı azot tankına yerleştirildi.

Muayene Maddelerinin Hücrelere Ekimi

1. Tam tabaka teşkil etmiş olan hücre kültür şişesindeki (75cm²) besiyeri alındı.
2. Hücreler pasaj işlemlerinde yapıldığı şekilde tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı.
3. Hücreler birbirinden ayrıldıktan sonra yaklaşık 10 mL devam besiyeri şişeye ilave edildi. Cam pipet yardımıyla pipetaj yapılarak hücrelerin şişe içerisinde homojen süspansiyonu sağlandı.
4. Hücre süspansiyonunun üzerine 20 mL devam besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu süspansiyondan 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarının her kuyucuğuna birer mL dağıtıldı ve 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda bir gün inkübe edildi.
5. Hücrelerin plak tabanını kaplayıp kaplamadığı invert mikroskop ile kontrol edildi. Plak tabanı hücre ile kaplandıktan sonra plak içinden besiyeri pipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden alındı.
6. Muayene maddesi içeren taşıma besiyerleri iki dakika vortekslendi ve taşıma besiyerinden 200 µl alınarak hücre içeren kuyucuklara ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda bir saat inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresinin sonunda pipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden hasta örnekleri boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 1 mL devam besiyeri eklendi.

8. Her gün invert mikroskop ile hücreler incelenerek sitopatik etki değerlendirildi.
9. Bu süre içerisinde rengi sarıya dönen (hücre metabolizmasından dolayı asidik ortamın oluşması) besiyerleri yenisi ile değiştirildi.
10. Hücre kültürüne inokülasyondan sonra 8. günde, sitopatik etki görülen ve görülmeyen bütün örneklerdeki devam besiyeri pipet yardımıyla boşaltıldı.
11. Plak tabanındaki hücreler ucu künt, plastik pastör pipetleri ile kazındı ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan bu hücre süspansiyonunda immünofloresan yöntemi ile *Adenovirus* antijeni iki farklı kit kullanılarak araştırıldı.

Konvansiyonel Hücre Kültüründe *Adenovirüs* Antijeninin Direkt İmmünofloresan Yöntemle Araştırılması

Süspansiyon haline getirilen hücrelerde *Adenovirüs* antijeni direkt immünofloresan yöntemle (Argene, Fransa) kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Kit içeriği

- Primer antikor (FITC ile işaretli antikor)

Testin yapılışı;

1. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan pipet yardımıyla 30 µl alınıp teflon kaplı lamın bir kuyucuğuna damlatıldı ve oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
2. Kuruyan preparat üzerine aseton damlatılarak tamamen buharlaşmaya kadar bekletildi.
3. Preparat üzerine bir damla FITC ile işaretli primer antikor damlatıldı ve nemli ortamda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
4. Teflon kaplı lam PBS ile 5 dakika süreyle yıkandı.
5. Preparat üzerine bir damla gliserinli PBS damlatılarak lamel kapatıldı.

6. Preparatlar floresan mikroskopta x20 ve x40'lık objektif ile incelendi. *Adenovirüs*'e özgü floresan veren antijenler araştırıldı. Bir tane floresan veren hücre görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

Hücre Kültüründe *Adenovirüs* Antijeninin Direkt İmmünofloresan Yöntemle Farklı Kit Kullanılarak Araştırılması

Süspansiyon haline getirilen hücrelerde *Adenovirüs* antijeni direkt immünofloresan yöntemle (Vircell, İspanya) kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Kit içeriği

- Monoklonal antikor 2 mL (FITC ile işaretli antikor)
- Birer adet pozitif ve negatif kontrol

Testin yapılışı;

1. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan pipet yardımıyla 30 µl alınıp teflon kaplı lamin bir kuyucuğuna damlatıldı ve oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
2. Kuruyan preparat üzerine aseton damlatılarak tamamen buharlaşınca kadar bekletildi.
3. Fiksasyon aşamasından sonra her bir lamel üzerine 25 µl FITC ile işaretli monoklonal antikor damlatıldı ve nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda lamalar PBS ile 10 dakika boyunca yıkandı.
5. Preparat üzerine bir damla gliserinli PBS damlatılarak lamel kapatıldı.
6. Preparatlar floresan mikroskopta x20 ve x40'lık objektif ile incelendi. *Adenovirüs*'e özgü floresan veren antijenler araştırıldı. Bir tane floresan veren hücre görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. ADENOVİRÜS'ÜN SHELL-VIAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU

Adenovirüs izolasyonunda HEP-2 hücreleri içeren shell-vial tüpleri (Vircell, İspanya) kullanıldı. Çalışmanın bütün aşamaları önceden % 70'lik alkolle silinmiş ve ultraviyole ışınlarına maruz bırakılmış laminar akımlı kabinde yapıldı. Shell-vial hücre kültüründe izolasyon işlemi 24 klinik örneğe uygulandı.

1. Shell-vial tüplerinin içindeki besiyeri boşaltıldı.
2. Hasta örnekleri iki dakika vortekslendi ve 200 µl alınarak tüplere ekim yapıldı.
3. Ekim yapıldıktan sonra 1200 rpm devirde 45 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası tüpler 37 °C'de bir saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası tüplerin içindeki örnekler boşaltıldı ve her birine 1'er mL devam besiyeri eklendi.
6. Tüpler üç gün boyunca 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Bu sürenin sonunda monoklonal antikor kiti (Vircell, İspanya) ile *Adenovirüs* antijeni araştırıldı.

Shell-vial Hücre Kültüründe *Adenovirüs* Antijeninin Direkt İmmünofloresan Yöntemle Araştırılması

Shell-vial hücre kültüründe direkt immünofloresan yöntemle (Vircell, İspanya) *Adenovirüs* antijeni kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Kit içeriği

- Monoklonal antikor 2 mL (FITC ile işaretli antikor)
- Birer adet pozitif ve negatif kontrol

Testin yapılışı;

1. Bütün tüplerin içindeki devam besiyeri boşaltıldı.
2. Ateşle yakılan steril birer bistüri ile tüplerin içindeki lameller çıkarıldı. Her defasında yakılarak steril edilen penset ile lameller lam üzerine yapıştırıcı yardımıyla yerleştirildi.

3. Lamellerin üzerine aseton eklenerek 10 dakika süreyle kuruması beklenip fiksasyon sağlandı.
4. Fiksasyon aşamasından sonra her bir lamel üzerine 25 µl FITC ile işaretli monoklonal antikor damlatıldı ve nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda lamalar PBS ile 10 dakika boyunca yıkandı.
6. Preparat üzerine bir damla gliserinli PBS damlatılarak lamel kapatıldı.
7. Preparatlar floresan mikroskopta x20 ve x40'luk objektif ile incelendi. *Adenovirüs*'e özgü floresan veren antijenler araştırıldı. Bir tane floresan veren hücre görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

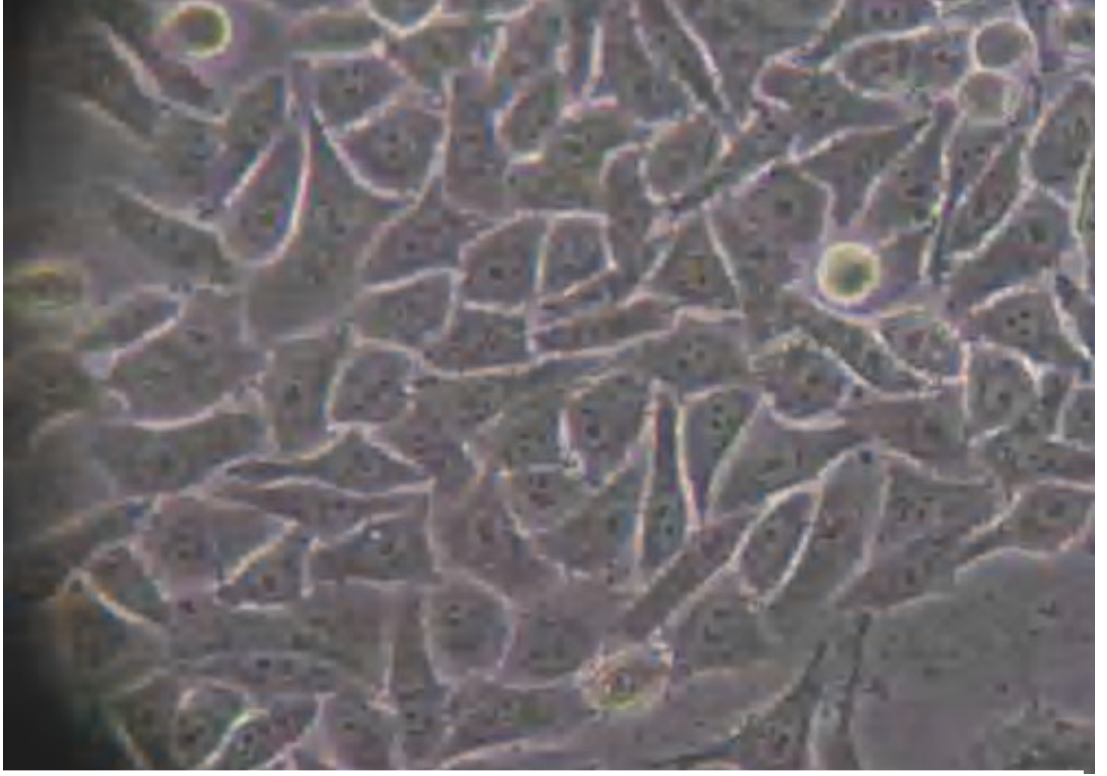
Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniğine konjonktivit ön tanısı ile başvuran ve adenoviral konjonktivit düşünülen 50 hastadan konjonktival sürüntü örneği alınarak çalışmaya dahil edildi.

4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI

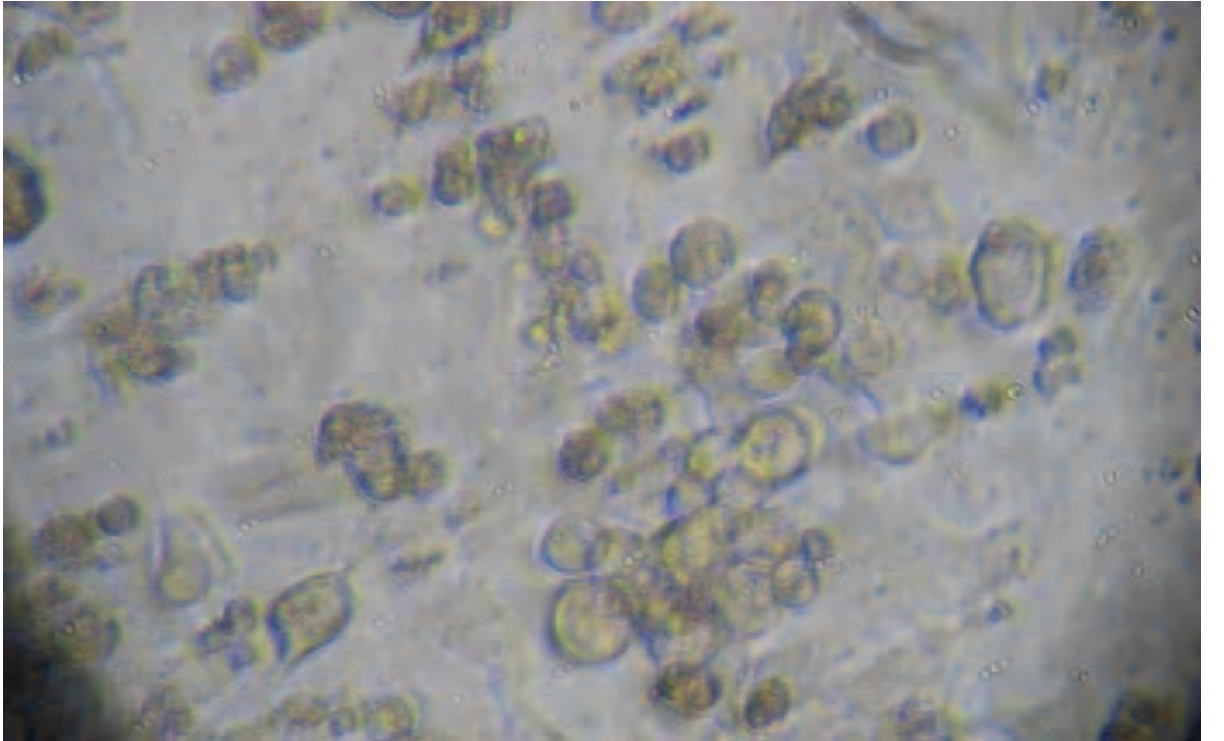
PCR ile çalışılan toplam 50 sürüntü örneğinin 23'ünde (%46) *Adenovirüs* DNA pozitif bulundu.

4.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE HEP-2 HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

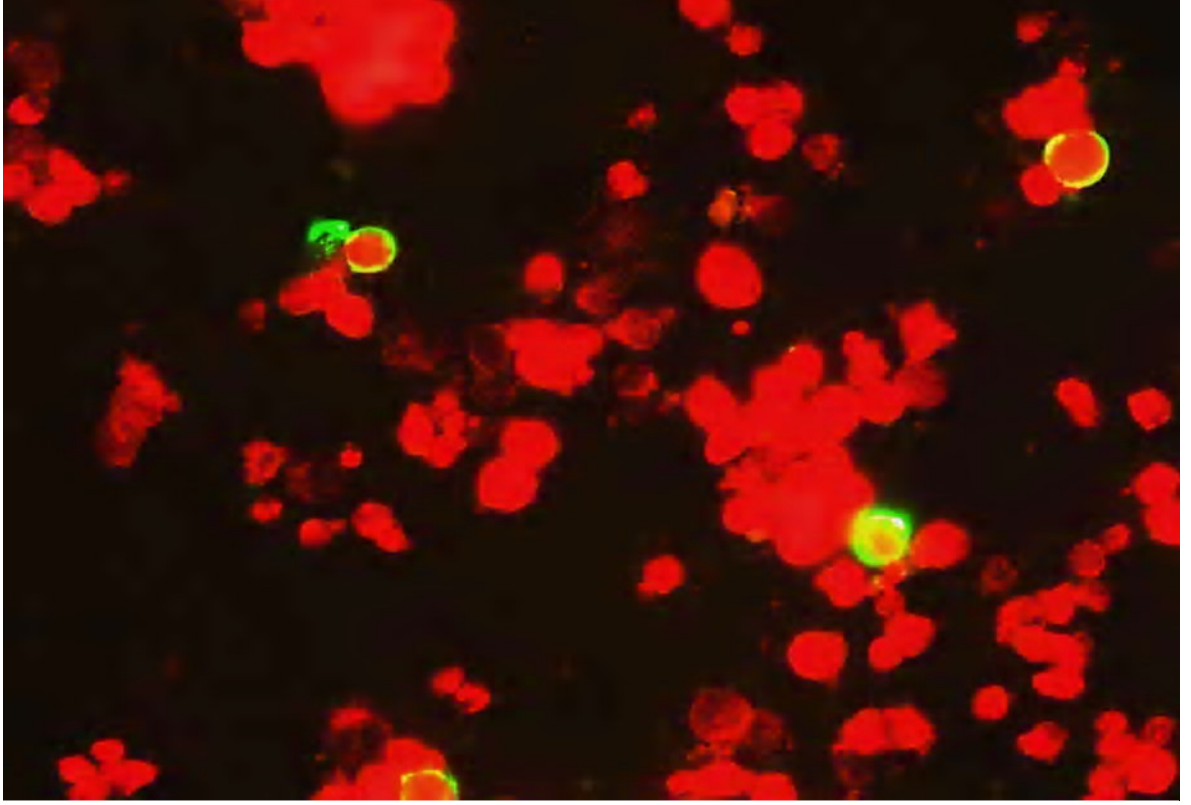
Tek tabaka halindeki HEP-2 hücre kültürünün görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir. HEP-2 hücre kültürüne ekim yapılan konjonktival sürüntü örneğinin hücre kültüründe 8. gündeki *Adenovirüs* sitopatik etkisi Şekil 3'te gösterilmiştir. HEP-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 50 sürüntü örneği immünofloresan yöntemle incelenerek, 19'u (%38) Argene kiti ile pozitif bulunurken (Şekil 4), 13'ü (%26) Vircell kiti ile pozitif bulundu. Hücre kültüründe Argene kiti ile elde edilen sonuçlar, çalışmanın hücre kültürü bulguları olarak değerlendirildi.



Şekil 2. Tek tabaka halindeki HEp-2 hücre kültürü



Şekil 3. HEp-2 hücre kültüründe *Adenovirüs*'ün yaptığı sitopatik etki (8. gün)



Şekil 4. HEp-2 hücre kültüründe direkt immüno Floresan (Argene, Fransa) yöntemi ile *Adenovirüs* antijeninin gösterilmesi

PCR yöntemi ile pozitif bulunan 23 konjonktival sürüntü örneğinin 19'u HEp-2 hücre kültürü yöntemi ile pozitif bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Konjonktival sürüntü örneklerinde PCR ve HEp-2 hücre kültürü bulgularının karşılaştırılması

PCR yöntemi	HEp-2 hücre kültürü yöntemi		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	19	4	23
Negatif	0	27	27
Toplam	19	31	50

4.3. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE SHELL-VİAL HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

Shell-vial hücre kültürüne ekim yapılan 24 adet konjonktival sürüntü örneğinin PCR ve HEp-2 hücre kültürü yöntemleri ile ayrı ayrı karşılaştırılması Tablo 3 ve Tablo 4'te gösterilmiştir. Shell-vial hücre kültürüne ekimi yapılan 24 sürüntü örneğinin 17'si immüno Floresan yöntemi ile pozitif bulundu (Şekil 5).

Tablo 3. Shell-vial hücre kültürüne ekilen konjonktival sürüntü örneklerinin PCR yöntemi ile karşılaştırılması

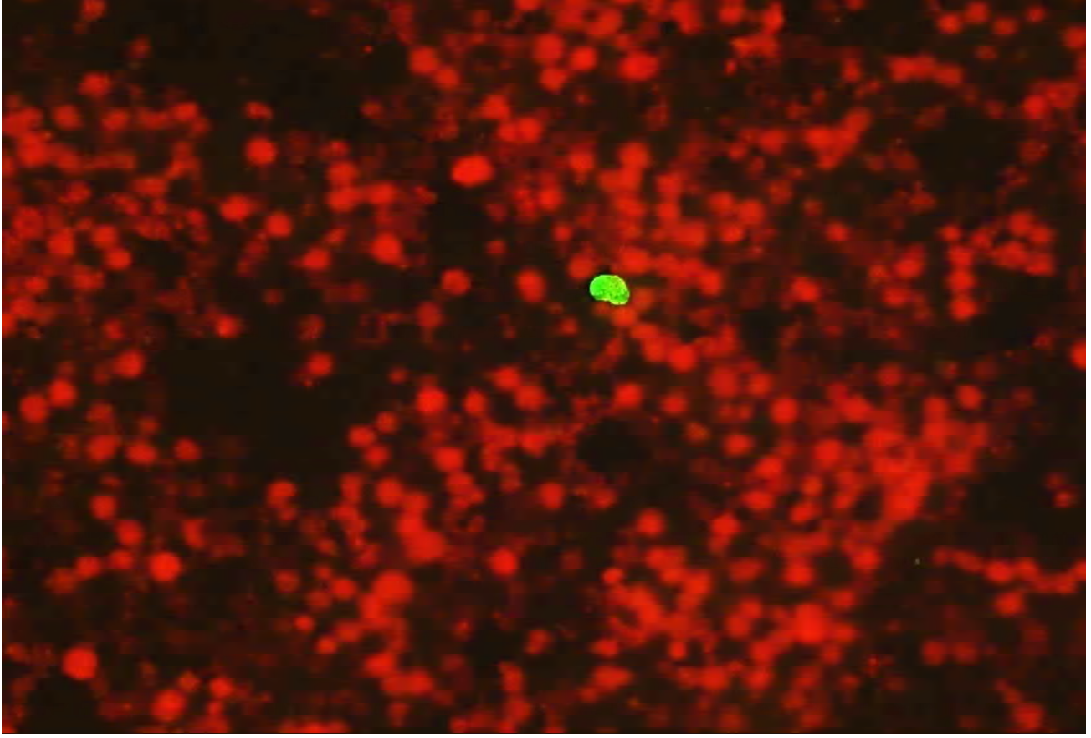
PCR yöntemi	Shell-vial hücre kültürü yöntemi ^x		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	17	6	23
Negatif	0	1	1
Toplam	17	7	24

^x Shell-vial hücre kültürü yöntemi ile sadece 24 hasta örneği çalışılmıştır.

Tablo 4. Shell-vial hücre kültürüne ekilen konjonktival sürüntü örneklerinin HEp-2 hücre kültürü yöntemi ile karşılaştırılması

HEp-2 hücre kültürü yöntemi	Shell-vial hücre kültürü yöntemi ^x		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	17	2	19
Negatif	0	5	5
Toplam	17	7	24

^x Shell-vial hücre kültürü yöntemi ile sadece 24 hasta örneği çalışılmıştır.



Şekil 5. Shell-vial hücre kültüründe direkt immüno Floresan yöntemi ile *Adenovirüs* antijeninin gösterilmesi

4.4. PCR, HEP-2 VE SHELL-VİAL HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Konjonktival sürüntü örneklerinde PCR, HEp-2 hücre kültürü ve shell-vial hücre kültürü bulguları karşılaştırılarak Tablo 5’te özetlendi.

Her üç yöntemle de toplam 17 örnek pozitif olarak bulundu. İki örnek PCR ve HEp-2 hücre kültürü yöntemleriyle pozitif bulunurken, shell-vial yöntemiyle negatif olarak saptandı. Dört örnekte *Adenovirüs* DNA saptandı ancak bu örneklerde her iki hücre kültürü yöntemiyle de virüs izole edilemedi.

Tablo 5. Konjonktival sürüntü örneklerinde PCR, HEp-2 hücre kültürü ve shell-vial hücre kültürü bulgularının karşılaştırılması

Örnek Sayısı	PCR	HEp-2 Hücre Kültürü	Shell-vial Hücre Kültürü [×]
27	-	-	×
17	+	+	+
4	+	-	-
2	+	+	-

[×] Shell-vial hücre kültürü yöntemi ile sadece 24 hasta örneği çalışılmıştır.

HEp-2 hücre kültürü altın standart kabul edilip, diğer testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı. PCR yönteminin duyarlılığı % 100 ve özgüllüğü % 87, shell-vial hücre kültürünün duyarlılığı % 89 ve özgüllüğü % 100 olarak bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. PCR ve shell-vial hücre kültürü yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri

Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük(%)
PCR	100	87
Shell-vial Hücre Kültürü	89	100

5. TARTIŞMA

Adenovirüsler insanlarda solunum yolu enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, gastroenterit gibi geniş spektrumlu enfeksiyonlara neden olmaktadır (8). Hastane ve toplum kökenli viral konjonktivitlerde en sık görülen viral etkenler adenovirüslerdir (32). Göz enfeksiyonlarında bulaş parmaklar, ortak kullanılan eşyalar, medikal cihazlar ve yüzme havuzları aracılığıyla olmakta ve okullar, işyerleri ve hastane ortamlarında geniş çapta salgınlar görülebilmektedir (33). ABD ve Avrupa ülkelerinde oküler *Adenovirüs* enfeksiyonlarının insidansı ve epidemiyolojisi ile ilgili veriler kısıtlı olmakla beraber, Japonya’da ulusal surveyans çalışmaları ile yılda bir milyonun üzerinde vaka bildirilmiştir (29,30). Almanya’da doğrulanmış adenoviral konjonktivit vakası 2001 yılında 132, 2002 yılında 82, 2003 yılında 397 ve 2004 yılında 652 olarak bildirilmiştir (51). Enfeksiyon özellikle tropikal iklimle sahip, kalabalık yerlerde ve kötü hijyen koşullarında salgınlar şeklinde görülmektedir (52). Ülkemizde oküler adenovirüs enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Adenoviral göz enfeksiyonları asemptomatik enfeksiyondan ciddi konjonktivite kadar değişebilen formlarda olabilmektedir (23). Tanıda genellikle klinik görünüm ile karar verilmekte ve laboratuvar tanısına nadir olarak başvurulmaktadır (31). Viroloji laboratuvarlarında enfeksiyonun doğrulanması amacıyla konjonktival sürüntü örneklerinden antijen tayini ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır (10,20). Klinik örneğin mümkün olabildiği kadar erken dönemde alınması ve hücreden zengin olması, laboratuvar tanıda duyarlılığı arttırmaktadır (20). Ayrıca alınan örneklerin soğuk ortamda (2-8°C) laboratuvara hızla gönderilmesi de çok önemlidir (20). Yapılan

araştırmalarda da hastalığın geç fazında örnek alınması veya alınan örneklerin uygun olmayan koşullarda saklanması gibi nedenlerden dolayı pozitif sonuçların sayısının düşük olabildiği gösterilmiştir (51). Wölfel ve ark. (40) yaptığı çalışmada, gözden sürüntü örnekleri alınmadan önce lokal anestezi uygulanmasının elde edilen hücre sayısını arttırdığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada ticari olarak bulunabilen iki farklı viral transport besiyeri ile sodyum klorür içeren transport besiyerleri karşılaştırıldığında, sadece sodyum klorür içeren transport besiyerinin gerek virüs izolasyonu, gerekse kantitatif PCR sonuçlarını etkileyecek derecede daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (40). Çalışmamızda adenoviral konjonktivit n tanılı hastalardan akut dönemde herhangi bir anestezi ilaç uygulanmadan sürüntü örnekleri alınmış ve örnekler ticari olarak elde edilen bir viral transport besiyeri içinde -70°C’de çalışma gününe kadar muhafaza edilmiştir.

Adenoviral göz enfeksiyonları salgınlar şeklinde görülebildiği için, etkin tedavi ve kontrol önlemlerinin alınmasında hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (40,53). Klinik olarak adenoviral konjonktivit düşünüldüğünde tanının laboratuvar yöntemleriyle doğrulanması, gerekli hijyenik önlemlerin bir an önce alınması ve enfeksiyonun epidemiyolojik öneminin belirlenmesi açısından yararlı olmaktadır (5). Günümüzde birçok viroloji laboratuvarında enfeksiyonun doğrulanması amacıyla hücre kültürü yöntemleri ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır (5,48).

Adenoviral konjonktivit tanısında hücre kültüründe izolasyon altın standart yöntemdir (45). Adenovirüsler en iyi A549, HEp-2, HeLa gibi insan epitelyal hücre dizilerinde rerler (20). Konjonktival sürüntü örneklerinden virüs izolasyonu semptomların başlangıcından 9-14 gün sonrasına kadar mümkün olabilmektedir (50). Hücre kültürüne ekim yapıldıktan sonra pozitif sonuç alınma süresi çeşitli çalışmalarda 3-29 gün (ortalama 9 gün) olarak belirtilmiştir (27). Bu süreyi ortalama 6 gün olarak bildiren kaynaklar da mevcuttur (54). Epitelyal hücre dizilerinde adenovirüs üremesi sonucu hücreler yuvarlaklaşarak üzüm salkımına benzer kümelenmeler oluşturur (55). Adenovirüsler her ne kadar stabil olsalar da hücre kültüründe pH ve sıcaklık değişiklikleri, nem oranı, örnekteki virüs yoğunluğu, kullanılan besiyerinin özellikleri, hücrelerin canlılık durumu ve kullanılan hücrenin tipi virüsün üremesini etkileyebilmektedir (56). Bakteriyel veya fungal kontaminasyon ihtimali de göz ardı edilmemesi gereken bir durumdur (6). Yapılan bir çalışmada, alınan örnekten başka

patojenlerin de olması durumunda adenovirüs üremesi maskelenebileceği için sonuçların etkilendiği gösterilmiştir (56). Virüsler izole edildikten sonra immünofloresan, hemaglutinasyon inhibisyon veya nötralizasyon testleri ile doğrulama yapılmaktadır (47). Bu çalışmada HEp-2 hücre dizisi kullanılmış ve inokülasyondan sonra 8.günde sitopatik etki gözlenen ve gözlenmeyen bütün örnekler direkt immünofloresan yöntemi uygulanmıştır.

Ülkemizde Ankara bölgesinde HEp-2 hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada konjonktival sürüntü örneklerinden *Adenovirüs* izolasyon oranı %20 olarak bulunmuş, doğrulama yöntemi olarak da lateks aglutinasyon testi kullanılmıştır (31). Çalışmamızda doğrulama amacıyla iki farklı kit kullanılarak direkt immünofloresan yöntemi uygulanmıştır. İmmünofloresan yöntemlerinden birinde (Argene, Fransa) virüs izolasyon oranı % 38, diğerinde (Vircell, İspanya) % 26 olarak bulunmuştur.

Konvansiyonel hücre kültürü yöntemleriyle karşılaştırıldığında, shell-vial hücre kültürü daha hızlı sonuç vermektedir ancak bu yöntemin dezavantajı pahalı olmasıdır (27). Özellikle shell-vial yönteminde HEp-2, HeLa gibi epitelyal kökenli hücrelerin kullanımı adenovirüs tanısında daha da hızlı sonuç vermektedir (44). Shell-vial yönteminin duyarlılığı alınan örneğin tipine, santrifüj aşamasının süresine, ortamın sıcaklık derecesine, izole edilmesi amaçlanan virüsün özelliklerine, kullanılan hücre tipine, doğrulama amaçlı kullanılan antikörün özelliklerine, boyama ve fiksasyon aşamalarına bağlıdır (38). Percivalle ve ark. (11) adenoviral konjonktivitli hastalardan alınan sürüntü örneklerinde, konvansiyonel hücre kültürü ile shell-vial hücre kültürünün duyarlılıklarını eşit olarak bulmuş ve bu çalışmada shell-vial yönteminde sonuç alma süresi 3 gün iken konvansiyonel kültür yönteminde 9 gün olarak belirtilmiştir. Kowalski ve ark. (57) adenoviral konjonktivitli hastaların sürüntü örneklerini alarak konvansiyonel hücre kültürü ile shell-vial yöntemini karşılaştırmışlar ve shell-vial kültüründe duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 100 olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da pozitif sonuç alınması shell-vial yönteminde ortalama üç gün, konvansiyonel hücre kültüründe ise sekiz gün olarak belirlenmiştir. Oküler adenovirüs enfeksiyonlarının tanısında shell-vial yönteminin etkinliği konvansiyonel hücre kültürü ile eşit bulunmuş ve tanıda daha hızlı sonuç alınması nedeniyle tercih edilebileceği bildirilmiştir (57). Aynı çalışmada konvansiyonel hücre kültürü ile pozitif olarak belirlenen üç adet konjonktival sürüntü örneği shell-vial yöntemi ile negatif olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda konvansiyonel hücre kültürü yöntemiyle pozitif bulunan 19 konjonktival sürüntü örneğinin 17'si shell-vial yöntemiyle de pozitif bulunurken iki örnek negatif olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemde de HEp-2 hücre dizileri kullanılmıştır. Shell-vial yöntemiyle iki örneğin negatif bulunması santrifüj, fiksasyon veya boyama aşamalarındaki herhangi bir aksaklıktan kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada konvansiyonel hücre kültürü altın standart olarak kabul edildiğinde shell-vial yönteminin duyarlılığı % 89, özgüllüğü % 100 olarak bulunmuştur.

Günümüzde virüslerin tanısında birçok mikrobiyoloji laboratuvarında kantitatif sonuç veren real-time PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (10). Bu yöntem gerek hızlı sonuç verdiği, gerekse düşük miktarda da olsa genetik materyali tespit edebildiği için erken dönemde tedavi ve korunma önlemlerinin alınması açısından son derece etkilidir (19,57). Örnekteki viral yük miktarı kültür ile tespit edilemeyecek kadar düşükse veya virüs non-enfeksiyöz özellikteyse viral genomun amplifikasyonu ve belirlenmesi yüksek duyarlılık sağlamaktadır (6). Son yapılan araştırmalarda adenoviral konjonktivit tanısında PCR yönteminin hücre kültürüne göre daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (7,9,11,45,56). Percivalle ve ark. (11) konjonktival sürüntü örneklerinde PCR, DFA ve konvansiyonel hücre kültürü yöntemleriyle *Adenovirüs* araştırmışlar ve duyarlılık oranlarını hücre kültürü için % 76,9, PCR için % 88,4 olarak, özgüllük oranlarını ise her iki yöntem için de % 100 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada real-time PCR yönteminin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 87 olarak bulunmuştur. Wölfel ve ark. (40) konjonktival sürüntü örneklerinde hızlı hücre kültürü ve real-time PCR yöntemlerini uygulamışlar ve oftalmolojik tarama açısından hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle real-time PCR yönteminin daha elverişli olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan bir çalışmada real-time PCR yönteminin adenoviral konjonktivit salgınlarında tarama amaçlı kullanımını tavsiye etmişlerdir (23). İlaveten Damen ve ark. (2) gerek araştırma, gerekse tanı protokollerinde real-time PCR yönteminin önemini vurgulamışlardır.

Bu çalışmada 23 adet konjonktival sürüntü örneği real-time PCR yöntemiyle pozitif bulunmuş ancak bu örneklerin hepsinden konvansiyonel ve shell-vial hücre kültürü yöntemleriyle *Adenovirüs* izole edilememiştir. Shell-vial yöntemi ile 24 klinik örnek çalışılabilmiştir. Her ne kadar hastalardan akut dönemde örnek alınmış olsa da adenoviral konjonktivit tablosu içinde kronik veya persistan enfeksiyonlar da söz

konusu olabilmekte, bu durumda PCR yöntemi ile pozitiflik görülebilmektedir. Ayrıca sürüntü örnekleri -70 °C’de aylarca beklemiştir. PCR yöntemi ile canlılığını kaybetmiş virüsün genomu da tespit edilebildiğinden, bu yöntemle pozitif bulunan örneklerin hepsinin hücre kültüründe izole edilememesi olağandışı değildir.

6. SONUÇLAR

Oküler adenovirüs enfeksiyonları çok kolay bulaşmaları ve hızlı yayılmaları nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu nedenle yalnız bir vaka tespit edilse bile hızlı tanının ve bulaştırıcılığı önlemenin sağlanması gereklidir. Ülkemizde bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Konvansiyonel hücre kültürü yöntemleri hala önemini korumakta ancak uzun sürede sonuç vermeleri, deneyimli personel ve ekipman gerektirmeleri dezavantajlarını oluşturmaktadır. Shell-vial hücre kültürü yöntemi, konvansiyonel hücre kültürü yöntemine kıyasla daha kısa sürede sonuç vermektedir ve uygun şartlar mevcut ise tanıda kullanılabilir. Hücre kültürü yöntemlerine kıyasla daha kısa sürede sonuç veren ve duyarlılığı son derece yüksek olan real-time PCR yönteminin, adenoviral göz enfeksiyonlarının tanısında kullanılmasının daha uygun olacağı kanaatine varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Ishiko H, Shimada Y, Konno T, et al. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2002-8.
2. Damen M, Minnaar R, Glasius P, et al. Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes. *J Clin Microbiol* 2008;46(12):3997-4003.
3. Maranhao AG, Soares CC, Albuquerque MC, Santos N. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009;51(4):227-9.
4. Butt AL, Chodosh J. Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea* 2006;25(2):199-202.
5. Meyer-Rüsenberg B, Loderstadt U, Richard G, Kaulfers P, Gesser C. Epidemic keratoconjunctivitis. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(27):475-80.
6. Echavarria M. Adenoviruses in immuncompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(4):704-15.
7. Buckwalter SP, Teo R, Espy MJ, Sloan LM, Smith TF, Pritt BS. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):766-71.

8. Nakamura M, Hirano E, Kowada K, et al. Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui prefecture, Japan, 1995-2010. *J Med Virol* 2012;84:81-6.
9. Matsui K, Shimizu H, Yoshida A, Nagaoka E, Nishio O, Okuda K. Monitoring of adenovirus from conjunctival scrapings in Japan during 2005-2006. *J Med Virol* 2008;80:997-1003.
10. Echavarria M. Adenoviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P (eds), *Principles & Practice of Clinical Virology* (6th ed) Wiley-Blackwell Press, UK 2009, pp.463-89.
11. Percivalle E, Sarasini A, Torsellini M, et al. A comparison of methods for detecting adenovirus type 8 keratoconjunctivitis during a nosocomial outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Clin Virol* 2003;28:257-64.
12. Levent F, Greer JM, Snider M, Demmler-Harrison GJ. Performance of a new immunochromatographic assay for detection of adenoviruses in children. *J Clin Virol* 2009;44:173-5.
13. Leppard KN. Adenoviruses: Molecular Biology. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds), *Desk Encyclopedia of General Virology* (1st ed) Academic Press, USA 2010, pp.419-26.
14. Shenk T. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology* (3rd ed) Lippincott-Raven Press, Philadelphia 1996.
15. Ishiko H, Aoki K. Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2678-9.
16. Lebeck MG, McCarthy TA, Capuano AW, et al. Emergent US adenovirus 3 strains associated with an epidemic and serious disease. *J Clin Virol* 2009;46:331-6.
17. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Research* 2006;71:172-80.

18. Tuncer S. Adenovirüsler. Kitabında: Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (1.baskı). Güneş Kitabevi, Ankara 1999.
19. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 2008;18:357-74.
20. Robinson C, Echavarria M. Adenoviruses. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology* (10th ed). ASM Press, Washington 2011.
21. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2009;19:165-78.
22. Vorburger AS, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002;7:46-59.
23. Kaneko H, Maruko I, Iida T, et al. The possibility of human adenovirus detection from the conjunctiva in asymptomatic cases during nosocomial infection. *Cornea* 2008;5:527-30.
24. Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol* 2006;40:7132-40.
25. Van Heerden J, Ehlers MM, Van Zyl WB, Grabow WOK. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research* 2003;37:3704-8.
26. Kaye SB, Lloyd M, Williams H, et al. Evidence for persistence of adenovirus in the tear film a decade following conjunctivitis. *J Med Virol* 2005;77:227-31.
27. Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, et al. Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis* 2010;16:2132-6.
28. Henquell C, Boeuf B, Mirand A, et al. Fatal adenovirus infection in a neonate and transmission to health-care workers. *J Clin Virol* 2009;45:345-8.
29. Hovding G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol* 2008;86:5-17.
30. Kinchington PR, Romanowski EG, Gordon YJ. Prospects for adenovirus antivirals. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:424-9.

31. Yağcı R, Akçalı A, Yağcı S, et al. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol* 2010;20(4):669-74.
32. Kaneko H, Mori S, Suzuki O, et al. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Research* 2004;61:63-6.
33. Mahmood AR, Narang AT. Diagnosis and management of the acute red eye. *Emerg Med Clin N Am* 2008;26:35-55.
34. Mueller JB, McStay CM. Ocular infection and inflammation. *Emerg Med Clin N Am* 2008;26:57-72.
35. Van Heerden J, Ehlers MM, Grabow WOK. Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J Appl Microbiol* 2005;99:1256-64.
36. Chodosh J, Astley RA, Butler MG, Kennedy RC. Adenovirus keratitis: a role for interleukin-8. *IOVS* 2000;41(3):783-9.
37. Irving W, Ala'Aldeen D, Boswell T. *Medical Microbiology* (1st ed). Taylor&Francis Group, UK 2005.
38. Liesegang TJ. Ocular viral infections. In: Jerome KR (ed), *Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections* (4th ed) Informa Healthcare, New York 2010, pp.425-48.
39. Forman MS, Valsavakis A. Specimen Collection, Transport and Processing: Virology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology* (10th ed). ASM Press, Washington 2011.
40. Wölfel R, Pfeffer M, Essbauer S, Nerkelun S, Dobler G. Evaluation of sampling technique and transport media for the diagnostics of adenoviral eye infections. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:1497-1504.
41. Winn JR, Janda W, Koneman E, et al (eds), *Diagnosis of Infections Caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia and Related Organisms*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (6th ed) Lippincott Williams&Wilkins Press, USA 2006, pp.1327-1419.

42. Ustaelebi Œ, Us D. Genel Viroloji (2. Baskı). Pelikan Yayıncılık, Ankara 2008.
43. Kudesia G, Wreghitt T. Clinical and Diagnostic Virology (1st ed). Cambridge University Press, New York 2009.
44. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immuncompromised host. Rev Med Virol 2003;13:155-71.
45. Jin X, Ishii A, Aoki K, Ishida S, Mukasa K, Ohno S. Detection of human adenovirus hexon antigen using carbon nanotube sensors. J Virol Meth 2011;171:405-7.
46. Bozkaya E, Aafıdan A. Hücre Kltrleri ve Tanıda Kullanımı (1.baskı). Suvari Matbaa, İstanbul 2011.
47. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al (eds). Jawetz, Melnick&Adelberg's Medical Microbiology (26th ed). McGraw-Hill Press, USA 2013.
48. Cheung D, Bremner J, Chan JTK. Epidemic keratoconjunctivitis - do outbreaks have to be epidemic? Eye 2003;17:356-63.
49. iek C, Œanlıdağ T, Akçalı S, Sayan M, Yalaz M, Metin DY. Klinik örneklerden izole edilen adenovirusların PCR ve DNA dizi analizi yöntemiyle tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2012;46(4):607-13.
50. Ersoy Y, Otlu B, Trkoğlu P, Yetkin F, Aker S, Kuzucu C. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 2012;80:144-49.
51. Schrauder A, Altmann D, Laude G, et al. Epidemic conjunctivitis in Germany, 2004. Eurosurveill 2006;11:185-7.
52. Lernout T, Maillard O, Boireaux S, Collet L, Filleul L. A large outbreak of conjunctivitis on Mayotte Island, France, February to May 2012. Eurosurveill 2012;17:23.
53. Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. Arch Virol 2006;151:1587-1602.

54. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). Medical Microbiology (7th ed). Elsevier Saunders Press, Philadelphia 2013.
55. Gray J. Assays for Virus Infection. In: Cann AJ (ed), Virus Culture: A Practical Approach (1st ed) Oxford University Press, New York 1999, pp.81-109.
56. Huang M, Nguy L, Ferrenberg J, Boeckh M, Cent A, Corey L. Development of multiplexed real-time quantitative PCR assay for detecting human adenoviruses. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;62(3):263-71.
57. Kowalski RP, Karenchak LM, Romanowski EG, Gordon YJ. Evaluation of the shell vial technique for detection of ocular adenovirus. Ophthalmol 1999;106(7):1324-7.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Aslı KİRAZ'a ait "Konjonktivitli Hastalarda Adenovirüsün Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması" adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 14.08.2013

Onay

Başkan Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Üye Prof. Dr. A. Nedret KOÇ

Üye Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU (Danışman)

İmza
.....
.....
.....