

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KERATOKONJONKTİVİT YAPAN
ADENOVİRUSLARIN GENOTİP PREVALANSI**

DR. BEGÜM NALÇA ERDİN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR, 2012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KERATOKONJONKTİVİT YAPAN
ADENOVİRUSLARIN GENOTİP PREVALANSI**

DR. BEGÜM NALÇA ERDİN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:

PROF. DR. AYÇA ARZU SAYINER

TEŐEKKÜR

Asistanlık hayatım boyunca bana her türlü desteği sunan, eğitim hayatıma ve tez çalışmama bilgisi ve tecrübeleriyle yön veren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Ayça Arzu Sayiner'e ve yetişmemde büyük emeği olan tüm hocalarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Sundukları sonsuz sevgi, anlayış ve destekle hayatımın her anında yanımda olan aileme, tanıştığım günden beri hayatımı güzelleştiren eşim Soner Erdin'e ve hayatıma yaptıkları eşsiz katkılarından dolayı bütün arkadaşlarıma teőekkür ederim.

Begüm Nalça Erdin

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
GRAFİK DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
1. ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	1
2. SUMMARY-KEYWORDS	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1 Adenovirusların Genel Özellikleri	7
4.1.1 Adenovirusların Yapısı ve Sınıflandırılması.....	7
4.1.2 Adenovirusların Hücre İçine Girişi ve Replikasyonu	10
4.1.3 Adenovirusların Neden Olduğu Enfeksiyonlar, Patogenez ve Klinik.....	13
4.1.4 Adenovirusların Neden Olduğu Göz Enfeksiyonları.....	17
4.1.5 Adenovirus Enfeksiyonlarında Bağışık Yanıt.....	18
4.2 Adenovirusların Tanısı	18
4.2.1 İzolasyon Yöntemleri	19
4.2.2 Doğrudan Saptama.....	20
4.2.2.1 Mikroskopi.....	20
4.2.2.2 Antijen Saptama	21
4.2.2.3 Nükleik Asit Saptama.....	22
4.3 Adenovirusların Tiplendirilmesi	24
4.3.1 Nötralizasyon Testi.....	24

4.3.2 Hemaglutinasyon ve Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi.....	24
4.3.3 Restriksiyon Enzim Analizi	24
4.3.4 Nükleotid Dizi Analizi	25
4.4 Adenovirus Enfeksiyonlarından Korunma ve Tedavi	26
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
5.1 Gereç	27
5.1.1 Çalışma grubu.....	27
5.2 Yöntem	27
5.2.1 Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu	27
5.2.2 Gerçek Zamanlı PCR ile Adenovirus DNA'sının Kantitasyonu	27
5.2.3 Sekans PCR	28
5.2.4 PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi.....	30
5.2.5 Sekans Reaksiyonu	30
5.2.6 Sekans Analizi.....	31
6. BULGULAR.....	32
6.1 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	32
6.2 Sekanslama Sonuçları.....	32
7. TARTIŞMA.....	37
8. KAYNAKLAR.....	41

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: İnsan Adenoviruslarının Onkojenik Yetenek ve Morfolojik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	10
TABLO 2: Adenovirusların Doku Tropizmi	15
TABLO 3: Adenovirusların Neden Olduğu Hastalıklar ve Görüldüğü Yaş Grupları.....	16
TABLO 4: Gerçek Zamanlı PCR’da Kullanılan Primer ve Problar.....	28
TABLO 5: Sekans PCR’da Kullanılan Primerler.....	29
TABLO 6: Genotip 4 ve 8’in Yıllara ve Mevsimlere Göre Dağılımı	36

SEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 1: Adenovirusun Yapısı	7
ŞEKİL 2: Adenovirusun Farklı Antijenik Yapıdaki Kapsomerleri.....	8
ŞEKİL 3: Adenovirusun Kapsid ve Kor Proteinleri	9
ŞEKİL 4: Adenovirusun Hücre İçine Alınması ve Replikasyon Döngüsü.....	11
ŞEKİL 5: Adenoviral Genomun ve Transkripsiyon Ünitelerinin Haritası	12
ŞEKİL 6: Adenovirus Enfeksiyonlarının Patogenezi	14
ŞEKİL 7: Adenovirusun Elektron Mikroskop Görüntüsü	20
ŞEKİL 8: Bazı Örneklerden Elde Edilen PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Görüntüsü ..	30
ŞEKİL 9: Filogenetik Ağaç	33

GRAFİK DİZİNİ

GRAFİK 1: Saptanan Adenovirus Genotiplerinin Toplam Sayıları	34
GRAFİK 2: Saptanan Adenovirus Genotiplerinin Yıllara Göre Dağılımı	35

KISALTMALAR

Ad: Adenovirus

CAR: Coxsackie-Adenovirus Reseptörü

CPE: Sitopatik Etki

DBP: DNA Bağlayan Protein

DFA: Direkt Floresan Antikor

EIA: Enzim Immunoassay

EKK: Epidemik Keratokonjonktivit

FK: Foliküler Konjonktivit

FKA: Faringokonjonktival Ateş

HVR: "Hypervariable Region"

IEM: Immun Elektron Mikroskopisi

IF: Immun Floresan

ITR: "Inverted Terminal Repeat"

MLP: "Major Late Promoter"

NPC: Nükleer Por Kompleks

pTP: Prekürsor Terminal Protein

PCR: Polimeraz Zincir Tepkimesi

RE: Restriksiyon Endonükleaz

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

RFLP: "Restriction Fragment Length Polimorphism"

1. ÖZET

Keratokonjonktivit Yapan Adenovirusların Genotip Prevalansı

Dr. Begüm Nalça Erdin

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İnciraltı / İzmir-TÜRKİYE

Adenoviruslar insanda solunum sisteminde, gözde, üriner sistemde ve gastrointestinal sistemde enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bunlar arasında en sık rastlanan keratokonjonktivitlerdir. Keratokonjonktivite sıklıkla genotip 3, 4, 8, 19 ve 37 neden olur. Adenovirus keratokonjonktivitleri çok bulaşıcıdır ve epidemilere neden olabilir. Bu yüzden tanının hızlı ve doğru yapılması önemlidir. Tanıda sıklıkla hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntem olan PCR kullanılmaktadır. Genotipin belirlenmesi, spesifik tiplerle klinik tablo arasındaki ilişkiyi belirlemek ve virusun coğrafi dağılımını takip edebilmek açısından önemlidir. Bu konuda başta A.B.D ve Japonya kökenli olmak üzere yapılmış bir çok çalışma olmakla birlikte Türkiye ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmada 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran keratokonjonktivitli olgulardaki adenovirusların genotip prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, 2006 Ocak ve 2010 Ağustos ayları arasında viral konjonktivit / keratokonjonktivit ön tanısı ile gönderilen 488 konjonktiva sürüntüsünden PCR ile adenovirus DNA pozitif bulunan 213 örnek (%44) çalışma grubunu oluşturmuştur. Bunlardan 101 tanesi (%47) randomize olarak seçilerek DNA dizi analizi ile genotiplendirilmiştir. Genotiplendirme için viral hexon geninin "Hypervariable Region 7" (HVR-7) bölgesini de içeren ve genotipe göre farklılık gösteren 605-629 nükleotidlik fragman PCR ile saptanmış, elde edilen ampikonların sekans analizi yapılarak, referans "Gen-Bank" dizileriyle birlikte filogenetik ağaç yardımıyla değerlendirilmiştir. Genotiplendirme çalışmaları Erasmus Üniversitesi Viroloji Departmanı'nda gerçekleştirilmiştir.

Örneklerde 3, 4, 8, 11, 19, 22 ve 37 olmak üzere 7 adenovirus genotipi saptanmıştır. 101 örneğin %66.3'ünde genotip 8 ve %24.7'sinde genotip 4 bulunmuştur. Diğer beş genotip, örneklerin %8.9' unu oluşturmuştur. Genotip 8, 2008 dışındaki tüm yıllarda en sık saptanan genotip olurken, 2008 yılında en sık genotip 4'e rastlanmıştır.

Genotip 8, 2006 ve 2010 yılları arasında merkezimizde en sık rastlanan genotip olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da genotip 8'in birçok ülkede hem sporadik enfeksiyonlar hem de salgınlar sırasında en sık rastlanan genotip olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de oküler örneklerde adenovirus genotiplerini belirleyen iki adet çalışma vardır. Bu çalışmalarda incelenen örnek sayıları azdır ve çalışmalardan biri salgın incelemesidir. Her iki çalışmada da genotip 8 en sık saptanan genotip olmuştur.

Çalışmamız bu konuda Türkiye'de yapılan ve yaklaşık 5 yıllık bir dönemde değişiklikleri inceleyen ilk kapsamlı çalışmadır. Çalışmanın kısıtlılıkları, tek merkezli olması ve hastaneye başvuran olguları değerlendirmesidir. Türkiye'de adenoviruslara bağlı göz enfeksiyonlarının epidemiyolojisini değerlendirmek için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: adenovirus, genotip, keratokonjonktivit

2. SUMMARY

Genotype Prevalance of Adenoviruses Causing Keratoconjunctivitis

Dr. Begüm Nalça Erdin

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine

Medical Microbiology Department

Inciraltı / Izmir-TURKEY

Adenoviruses are common human pathogens that cause infections in eye, urinary system and gastrointestinal system. Keratoconjunctivitis is the most common type of adenoviral infection which is usually related to genotype 3, 4, 8, 19 and 37. Rapid and accurate diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis is necessary since it is very contagious and can cause epidemics. PCR is the most-preferred diagnostic method due its rapid, sensitive and specific nature. Genotyping of the adenovirus is also required in order to determine the relation between a specific type and clinical presentation and follow the geographical distribution of the virus. Many studies, especially from Japan and USA, have been published related to the topic, yet there is very limited data about ocular adenoviral infections in Turkey. This study aimed to determine the adenovirus genotypes among the patients with keratoconjunctivitis followed in Dokuz Eylül University Hospital between 2006 and 2010.

Between January 2006 and August 2010, 488 conjunctival swab samples of patients with a diagnosis of viral conjunctivitis / keratoconjunctivitis have been sent to the Molecular Microbiology Laboratory of Dokuz Eylül University Hospital to be tested for adenoviruses. Forty-four percent of these samples (213 of 488) have been found to be positive for the adenoviral DNA with PCR and generated the study group. Forty-seven percent of (101 of 213) positive samples were randomly chosen and genotyped by sequence analysis. Fragment of the hexon gene made up of 605-629 nucleotides, containing “Hypervariable Region 7” (HVR-7), has been targeted for the sequencing. Amplicons and the reference Gen-Bank sequences were analyzed by a phylogenetic tree. Genotyping studies were carried out in Erasmus University Virology Department.

Seven genotypes including 3, 4, 8, 11, 19, 22 and 37 were determined in the samples of the study. Type 8 was the dominant genotype detected in 67 samples (66.3%) while the second common genotype was 4 which determined in 25 (24.7%) of the samples. Other five genotypes were isolated in 8.9% of the samples. Genotype 8 was the most common type detected during the five-year period, except 2008, in which genotype 4 was the dominant type.

Genotype 8 was found to be the most common genotype between 2006 and 2010 in our center. Genotype 8 has been reported as the predominant genotype worldwide in both sporadic infections and during epidemics. There are two published studies about the adenovirus genotypes in ocular infections in Turkey. Although, sample size is very small and one of them is an investigation of an epidemic, genotype 8 is also the predominant genotype in both of the studies.

In conclusion, this is the first comprehensive study, providing data related to genotypes of adenoviruses that cause ocular infections and their variations during a five-year period in Turkey. Main limitations of the study are that it evaluated a single center and only patients applying to the hospital. Further studies are needed to understand the epidemiology of adenoviral ocular infections in Turkey.

Key words : adenoviruses, genotype, keratoconjunctivitis

3. GİRİŞ VE AMAC

Adenovirüsler tüm dünyada viral göz enfeksiyonlarında en sık rastlanan etkenlerdir (1). Bu enfeksiyonlar epidemik keratokonjonktivit (EKK), foliküler konjonktivit (FK) ve faringokonjonktival ateş (FKA) şeklinde görülebilir ve hastaların uzun süre iş yada okuldan uzak kalmasına, morbiditeye ve özellikle EKK tablosunda görmeyi etkileyen korneal infiltratlara neden olabilir (1).

Adenoviral keratokonjonktiviter sporadik vakalar şeklinde görülebilmekle birlikte toplumda, hastaneler ve okullar gibi toplu yaşanan yerlerde EKK tablosu ile ciddi salgınlara neden olabilirler. Sporadik vakalara, ülkeler, bölgeler ve yıllara göre farklı veriler olmakla birlikte, birçok adenovirüs genotipinin neden olabildiği ancak ciddi salgınlarla giden EKK tablosuna, sıklıkla genotip 8'in neden olduğu bildirilmiştir (2, 3). Adenoviral keratokonjonktiviter konusunda birçok ülkeden çok sayıda yayın olmakla birlikte bizim ülkemiz ile ilgili veriler sınırlıdır.

Çok bulaşıcı olan adenoviral göz enfeksiyonları hastalar ve hatta sağlık personeli arasında hızla yayılarak, polikliniğin yada yataklı servisin kapatılmasına kadar gidebilecek problemlere neden olabilirler. Adenovirüs enfeksiyonlarının hızlı bir şekilde tanınması, oluşabilecek salgınlara hazırlıklı olunması ve gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak yayılımın engellenmesi, hem toplum sağlığı hem de hastane enfeksiyonları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu konuda yapılacak epidemiyolojik çalışmalar, toplumda dolaşan adenovirüs genotiplerinin belirlenmesi ve salgınlara mevsimsel özelliklerinin saptanması konusunda veri sağlayarak salgınlara ilişkin önlemlerin alınmasına yardımcı olmaktadır.

Türkiye'den bu konuyla ilgili olarak sınırlı sayıda vaka ile yapılmış, birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar bölgemizde yada ülkemizde dolaşan adenovirüs genotipleri veya adenoviral keratokonjonktivit salgınları konusunda yeterli veri oluşturmamaktadır.

Bu çalışmada, 2006-2010 yılları arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran keratokonjonktivit olgularındaki adenovirüs prevalansının ve çalışma popülasyonunda dolaşan adenovirüs genotiplerinin

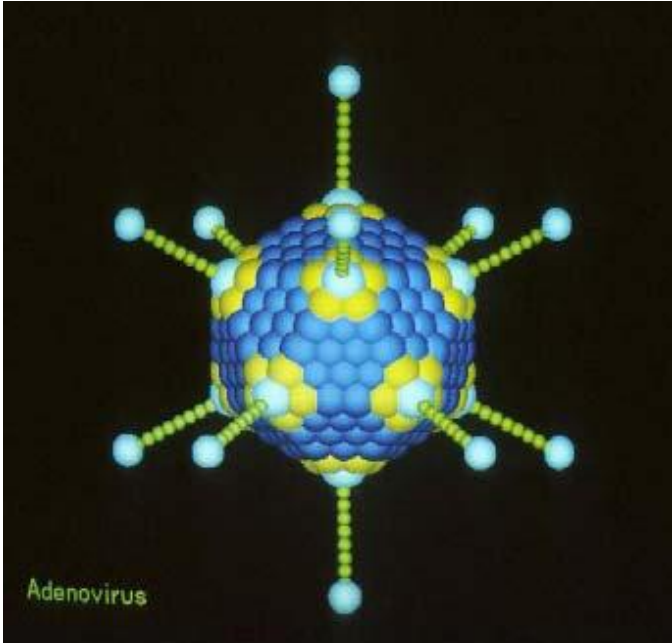
saptanması ve bu sayede bölgemiz yada ülkemizden yapılacak olan yeni epidemiyolojik çalışmalara ışık tutulması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Adenovirusun Genel Özellikleri

4.1.1 Adenovirusun Yapısı ve Sınıflandırılması

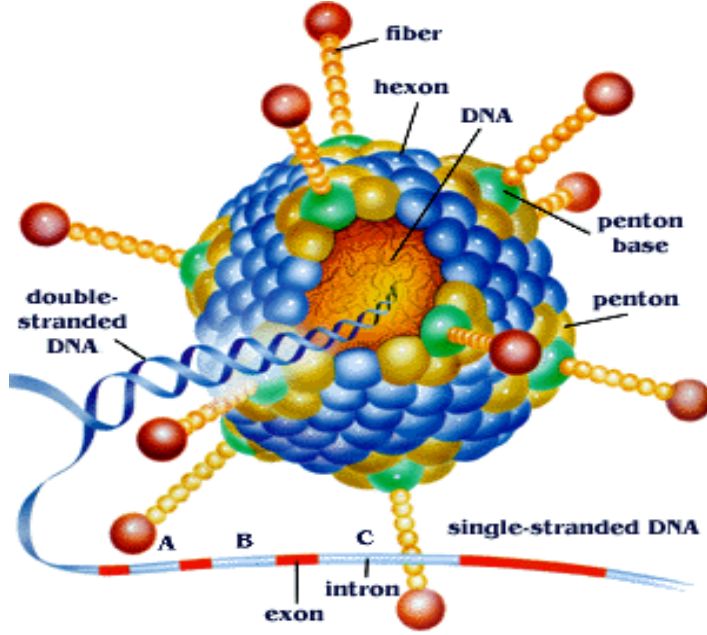
Adenoviruslar 1950'li yıllarda insan adenoidlerinden izole edilmiştir ve ilk kaynağını belirtmek üzere bu ismi almışlardır (4). Doğada yaygın olarak bulunurlar, insan ve hayvanlardan izole edilebilirler. Adenoviridae ailesinde yer alan 4 cinsten (Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus ve Siadenovirus) biri olan Mastadenovirus cinsi, memelileri enfekte eder. Mastadenovirus cinsinde yer alan insan adenovirusları 70-90 nm büyüklüğünde, çift sarmal lineer DNA içeren, ikozahedral simettrili, zarfsız viruslardır (Şekil 1).



Şekil 1: Adenovirusun yapısı (5)

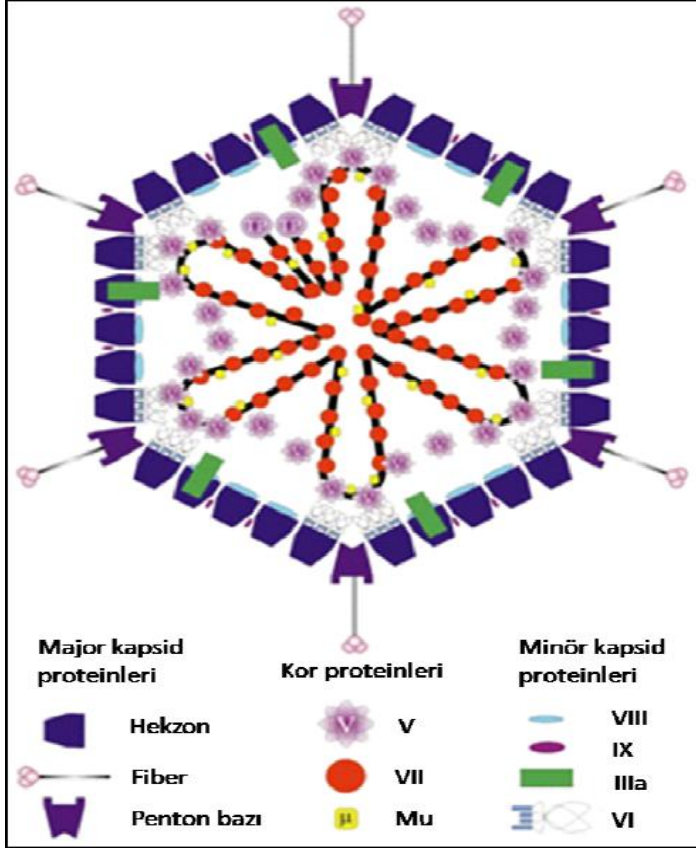
Adenovirusların protein kapsidinde, virusun sınıflandırılmasında ve hastalık tanısında önem taşıyan, antijenik yönden farklı, 3 tip kapsomer bulunmaktadır. Toplam 252 kapsomerin 12'sini köşelerde yer alan ve penton adı verilen; 240 tanesini ise yüzeyde yer alan ve hekzon adını alan

kapsomerler oluşturur. Pentonlardan çıkan iplik şeklindeki kapsomerler ise fiber adını alır (Şekil 2).



Şekil 2: Adenovirusun farklı antijenik yapıdaki kapsomerleri (6)

Hekzonun tüm insan adenoviruslarında ortak olan antijenik bölgeleri kapsidin içinde kalırlar ve bunlara karşı nötralizan antikorlar oluşturulamaz. Hekzonun ve fiberlerin tipe özgül olan ve serumda nötralizan antikorlar oluşturan bölgeleri bulunmaktadır. Fiberdeki antijenik belirleyicilerin in vitro hemaglutinasyondan sorumlu olduğu bilinmektedir (7). Penton antijeni ise tüm insan adenoviruslarında ortak antijenik özelliktedir ve virusların hücre kültüründe oluşturduğu erken sitopatik etkiden sorumludur (8). Bu üç major kapsid proteininin yanında, kapsid yapısını sabitlemeye yarayan minör kapsid proteinleri olan IIIa, VI, VIII ve IX bulunur. V, VII, Mu ve terminal protein (TP) ise kapsid içerisinde DNA'nın paketlenmesini sağlayan histon benzeri viral kor proteinleridir (Şekil 3). VII, DNA'yı paketler, TP ise DNA zincirlerinin 5' uçlarına bağlanır. Ayrıca, virion içerisinde adenovirusun hücre içi endozomdan kaçmak için kullandığı düşünülen adenoviral proteazlar bulunur.



Şekil 3. Adenovirusun kapsid ve kor proteinleri (9)

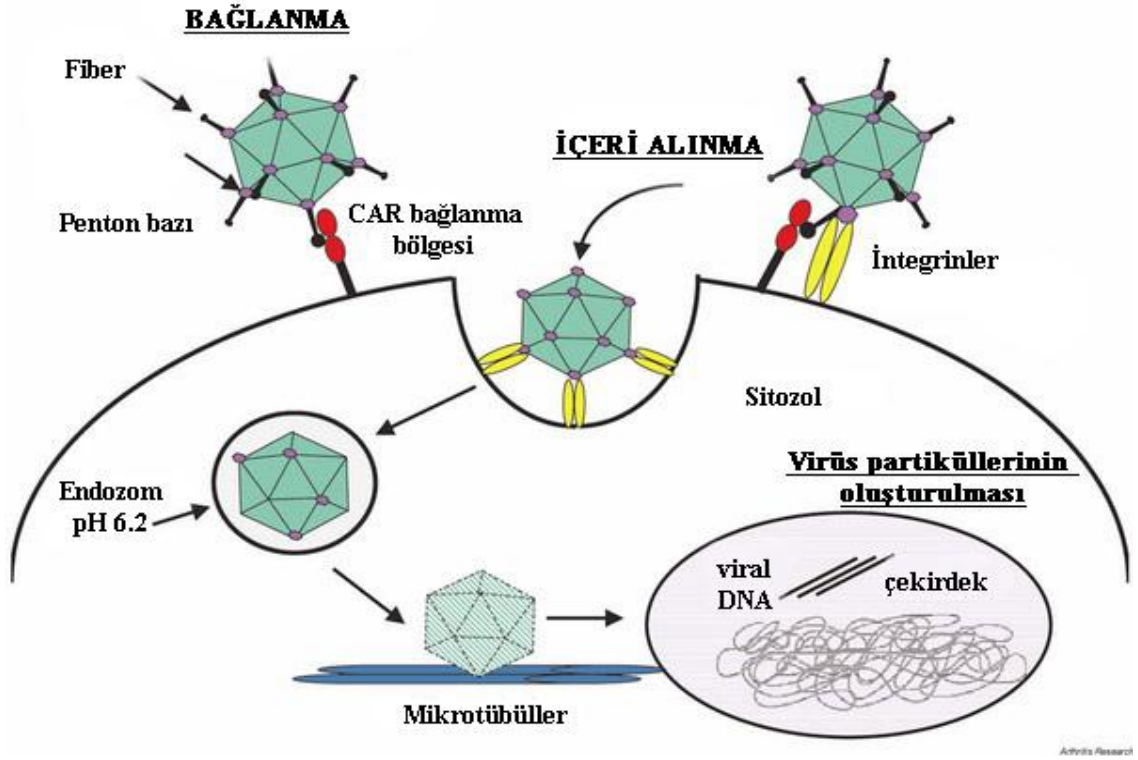
İnsan adenovirusları farklı özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmışlardır. En son 1999 yılında, nükleotid ve aminoasit sekansları baz alınarak 'International Committee on Taxonomy of Viruses' tarafından 6 tür ve 51 serotipe ayrılmışlardır (10). 6 türden oluşan A-F sınıflaması adenovirusların farklı türlere ait eritrositlerle gösterdiklere aglütinasyona göre yapılmıştır ancak morfoloji ve DNA özellikleri gibi diğer viral özellikler bu sınıflama ile uyumludur (Tablo 1).

Altgrup	Serotip	Onkojenik yetenek	Fiber uzunluğu (nm)	% DNA Homolojisi		SmaI RE analizi sonrası band sayısı	% G+C İçeriği
				Grup içi	Gruplar arası		
A	12,18,31	Kuvvetli	28-31	48-69	8-20	4-5	47-49
B	3,7,11,14,16 21, 34,35,50	Zayıf	9-11	89-94	9-20	8-10	50-52
C	1,2,5,6	Yok	23-31	99-100	10-16	10-12	57-59
D	8-10,13,15, 17,19, 20, 22-30, 32, 33,36-39, 42-49,51	Yok	12-13	94-99	4-17	14-18	57-60
E	4	Yok	17		4-23	16-19	57
F	40,41	Yok	29	62-69	15-22	9-12	52

Tablo 1: İnsan adenoviruslarının onkojenik yetenek ve morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması (7)

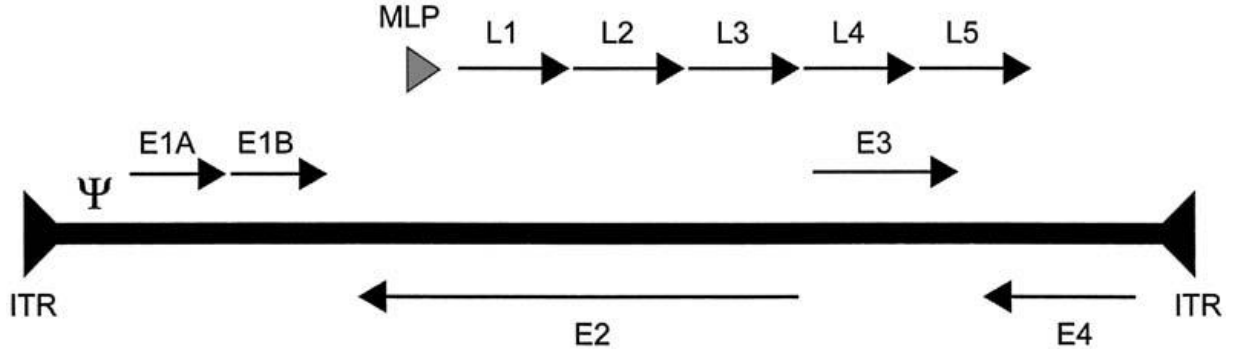
4.1.2 Adenovirusun Hücre İçine Girişi ve Replikasyonu

Group B dışındaki adenoviruslar konakçı hücrenin yüzeyine Coxsackie-Adenovirus Reseptör (CAR) aracılığıyla bağlanır. Grup B adenovirusların ise CD46, CD80/86, sialik asit ve heparan sulfat gibi hücre yüzey moleküllerini kullandıkları belirlenmiştir (11). Bu proteinlere bağlanan adenovirus, penton bazında eksprese edilen “RGD motifi” ile $\alpha\beta$ integrinlere bağlanarak klatrin bağımlı, reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır (12) (Şekil 4).



Şekil 4: Adenovirusun hücre içine alınması ve replikasyon döngüsü (12)

Virus dinein yardımı ile sitoplazma içinde mikrotübüllere bağlanarak çekirdeğe ilerler ve ardından “Nükleer Por Complex” (NPC) ile birleşir (13). NPC’de kapsidin ayrışması ile viral genom çekirdeğe girer ve viral transkripsiyon programı başlar. Adenovirus replikasyon siklusu özel viral genlerin eksprese edilme zamanına göre erken ve geç olarak ikiye ayrılabilir (11). Virus genomu çekirdek içine bırakıldıktan sonra, erken adenoviral genlerin (E1-E4) sentezi başlar ve genler erken adenovirus proteinlerinin yapımını sağlarlar (şekil 5). Bu erken proteinler diğer adenovirus transkripsiyon ünitelerinin transaktivasyonu, optimal viral replikasyonu sağlamak için hücre siklusunun deregülasyonu yada konağın antiviral immun yanıtının modülasyonu yoluyla fonksiyon gösterirler (11).



Şekil 5: Adenoviral genomun ve transkripsiyon ünitelerinin haritası. Merkezdeki kalın çizgi viral genomu simgeler. Sağ ve solda yer alan “Inverted terminal repeat” (ITR) yada ters yineleyen dizilerin konumları, paketlenme sekansı, erken transkripsiyon üniteleri (E1A, E1B, E2, E3, E4) ve major geç transkripsiyon üniteleri (MLP, L1-L5) gösterilmiştir (13).

Enfeksiyonu takiben yedi saat içinde E2 gen ürünleri birikir ve konak hücrenin ölümüne kadar sürecek olan viral DNA sentezi başlar. Adenovirus genomunun kendisi viral replikasyon için gerekli olan 3 protein kodlar: DNA bağlayan protein (DBP), prekürsor terminal protein (pTP) ve adenovirus DNA polimeraz. Buna ek olarak nükleer factor 1, 2, 3 gibi selüler proteinler de replikasyonu kolaylaştırır (14). Replikasyon özel bir protein-priming mekanizması ile başlar. Primer pTP viral DNA polimeraz ile ilişkiye girer, ters yineleyen diziler (inverted terminal repeat, ITR) bölgesinde yer alan replikasyon orijininde sıkı bir preinisiasyon kompleksi oluşturur ve bu şekilde replikasyon başlar (15). Bundan sonra, kalıp ipliğın 4.- 6. nükleotidlerin karşısına, pTP'nin serin rezidusuna kovalan bağ ile bağlı bir CAT trinükleotidi sentezlenir. pTP – CAT, ITR'lerin yardımı ile baz çiftleşmesine izin vermek üzere geriye doğru atlar. Bundan sonraki elongasyon için DBP ve adenovirus DNA polimeraz gereklidir. pTP ITR'lere bağlı kalır fakat enfeksiyonun geç safhalarında adenoviral proteinaz tarafından, daha küçük TP'lere parçalanır. Parental ipliklerden birtanesi tamamen duplike olduktan sonra, serbest kalan tek iplikli DNA molekülleri, her iki uçta yer alan ITR'ler aracılığıyla çembersel hale gelir ve replikasyon sürer (16). DNA replikasyonunun başlangıcından sonra, adenovirus major geç promoter (MLP) aktive olur ve geç genlerin ekspresyonu başlar. Bu genler viral yapısal proteinleri ve viral enkapsidasyon ve matürasyon için gerekli proteinleri kodlar.

Sitoplazmada sentezlenen yapısal proteinlerin de hücre çekirdeğine taşınması ile tam virus yapımı gerçekleştirilir. Tam virus oluşumu enfeksiyonu takiben üç gün içerisinde olur. Adenovirus E3-11.6K proteininin neden olduğu lizis ile hücre ölür ve adenoviruslar serbest kalır (17).

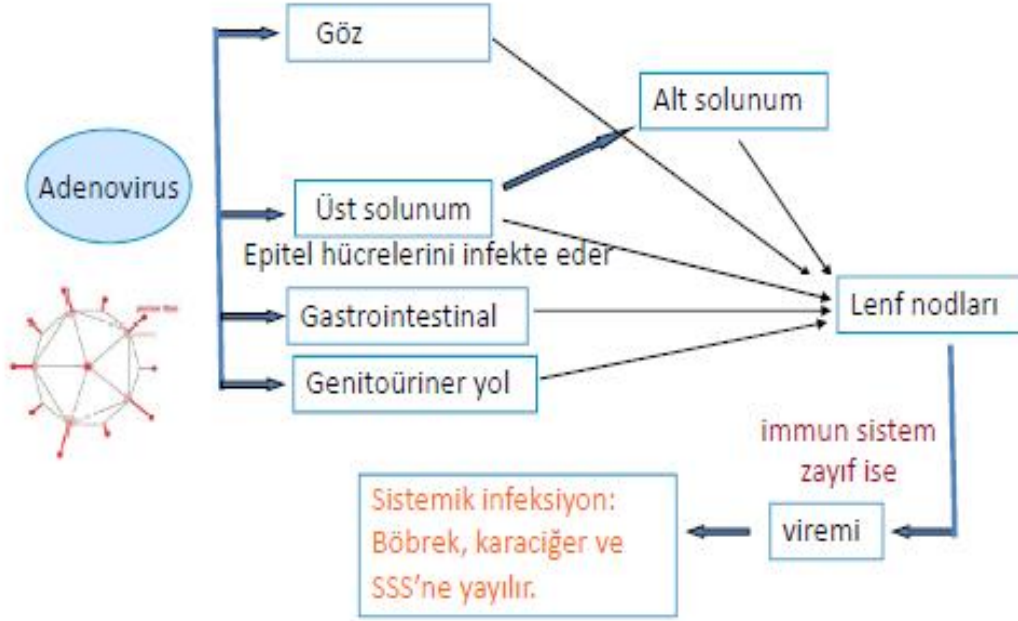
Öncül olarak viral bir protein kullanmaları ve çift iplikli DNA virusu olmalarına rağmen, genomlarını tek iplikli ara formlar aracılığıyla eşlemeleri adenovirus replikasyonunu ilginç kılar (18).

Adenoviruslar infekte ettikleri hücrelerin çekirdeklerinde replike olurken çekirdek içi bazofilik inklüzyonlar oluştururlar. Bu inklüzyonlar adenovirusların tanısında kullanılabilir.

4.1.3 Adenovirusların Neden Olduğu Enfeksiyonlar, Patogenez ve Klinik

Adenoviruslar hücre ile en az üç değişik yol ile etkileşim kurarlar. Bunlar: çoğunlukla epitel hücrelerinin içinde meydana gelen prodüktif enfeksiyon, bademcikler ve adenoidler gibi lenfoid doku ve mukozalarda meydana gelen latent veya persistan enfeksiyon ve başlıca A serotipi ile rodent hücrelerinde oluşan transformasyondur (7).

Virus temas, solunum damlacıkları ve sindirim yolu ile bulaşabilir. Epitel hücrelerini enfekte eder, çoğalır ve lenfoid dokuya yayılır. Genellikle bölgesel lenf nodüllerinin dışına yayılmaz. Ancak immun sistem zayıf ise viremi oluşturup sistemik enfeksiyona yol açabilir. Böbrek, karaciğer ve merkezi sinir sistemine yayılabilir. Hastalık iyileştikten sonra, tonsillerde, adenoidlerde ve diğer lenfoid dokularda (Peyer plakları, lökositler gibi) adenovirusun (özellikle C grubu) latent persistan enfeksiyonu yıllarca sürebilir ve immun sistemin baskılanması halinde kolayca reaktif olabilir (şekil 6).



Şekil 6: Adenovirus enfeksiyonlarının patogenezi (19)

Adenovirus enfeksiyonları temelde 4 ana başlık altında toplanabilir: solunum yolu enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve immünsüpresif hastalarda meydana gelen enfeksiyonlar. Adenovirus enfeksiyonları arasında en sık görülenler epidemik keratokonjonktivit ve faringokonjonktival ateştir (20).

Adenovirusların neden olduğu hastalıkların klinik seyri ve bulguları serotipe ve konağın immun durumuna göre değişiklik gösterir. Adenovirusların farklı serotipleri farklı doku ve organlara tropizm gösterir. C, E ve bazı B serotipleri tipik olarak solunum sisteminde enfeksiyona neden olurken, diğer B serotipleri üriner sisteme, A ve F serotipleri gastrointestinal sisteme, D serotipleri ise göze tropizm gösterirler (Tablo 2) (11,21, 22).

Grup	Doku tropizmi	Serotipler
A	Gastrointestinal yol	12, 18, 31
B	Üriner yol, Resp.yol	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50
C	Üst respiratuvar yol	1, 2, 5, 6
D	Göz, gastrointestinal yol	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51
E	Respiratuvar yol, göz	4
F	Gastrointestinal yol	40,41

Tablo 2: Adenovirusların doku tropizmi (11)

Enfeksiyonlar tüm dünyada yaygındır, yıl boyunca görülebilir. Fakat solunum yolu enfeksiyonları genelde kış sonu, ilkbahar ve yaz başında görülür.

Adenovirus enfeksiyonları her yaşta görülebilmekle birlikte, sıklıkla okul çağı çocuklarında görülür ve enfeksiyonların %50'si asemptomatiktir. Toplumdaki üst solunum yolu enfeksiyonlarının % 1-5'i, yeni askere alınanlardaki üst solunum yolu enfeksiyonlarının % 50'si, infant ve okul öncesi çocuklardaki akut gastroenteritlerin %5-15'i adenoviruslara bağlıdır (7). Askeri kamplarda özellikle serotip 4 ve serotip 7'nin neden olduğu solunum yolu enfeksiyonu salgınları bildirilmiştir (23, 24). Ülkemizden de 2005 yılında askeri bir kampta meydana gelen adenovirus salgını bildirilmiştir (25). Adenoviruslar viral konjonktivit etkenlerinin de başında gelir (7). Tablo 3'te adenovirusların neden olduğu hastalıklar ve bu hastalıkların görüldüğü yaş grupları özetlenmiştir.

HASTALIK	HASTA POPULASYONU
Solunum yolu hastalıkları	
Ateş ve ÜS YE	Süt çocuğu, küçük çocuklar
Faringokonjonktival ateş	Çocuklar ve gençler
Akut solunum yolu hastalıkları	Askeri personel
Boğmaca benzeri hastalık	Süt çocuğu, küçük çocuklar
Pnömoni	Süt çocuğu, küçük çocuklar Askeri personel, immunsuprese hastalar
Diğer hastalıklar	
Akut hemorajik sistit	Çocuklar, KİT hastaları
Epidemik keratokonjonktivit	Her yaş, böbrek transplant hastaları
Gastroenterit	Süt çocuğu , küçük çocuklar
Hepatit	Karaciğer transplantasyonu hastaları, immunsuprese hastalar
Meningoensefalit	Çocuklar, immunsuprese hastalar

Tablo 3: Adenovirusların neden olduğu hastalıklar ve görüldüğu yaş grupları

Adenovirusun neden olduğu hastalıklar genelde hafiftir ve sekelsiz iyileşir. Son yıllarda immun yetmezlikli hastaların artmasıyla birlikte adenovirusların neden olduğu ciddi ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlarda artış görölmüştür. Bu tür enfeksiyonlar özellikle hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılanlarda görülür. İlk kez 2005 yılında bir hematoloji ünitesinden adenovirusun neden olduğu ishal salgını bildirilmiştir (26). Enterit, hemorajik sistit, hepatit, ensefalit ve çoklu organ yetmezliği görülebilen klinik tablolar arasındadır. Vakaların çoğunda genel populasyonda nadir görülen B ve C serotipleri saptanmaktadır (11).

Bulaşma çoğunlukla fekal-oral yol ile olurken, kontamine eşyalar ve damlacıklı aerosoller aracılığı ile de olabilmektedir. Virüs, kontamine yüzeyler, eller, oftalmik aletler ve solusyonlar ile kolayca yayılır. Bu nedenle hastanelerde özellikle göz enfeksiyonları ve salgınlarına sık rastlanır. Toplu yaşam ortamlarında da (askeri birlikler, vb) salgınlar oluşturur ve aile içi enfeksiyonlar görülür.

Adenovirusun neden olduğu göz enfeksiyonlarına, çalışmamızın konusu olması nedeniyle daha ayrıntılı olarak değinilecektir.

4.1.4 Adenovirusun Neden Olduğu Göz Enfeksiyonları

Adenoviruslar, tüm dünyada viral göz enfeksiyonlarının en sık rastlanan ajanlarıdır (1). Bu enfeksiyonlar epidemik keratokonjonktivit (EKK), foliküler konjonktivit (FK) ve faringokonjonktival ateş (FKA) şeklinde görülebilir ve hastaların uzun süre iş yada okuldan uzak kalmasına, morbiditeye ve özellikle EKK tablosunda görmeyi etkileyen korneal infiltratlara neden olabilir (1). Göz enfeksiyonlarına çoğunlukla subgrup D'nin elemanları (serotip 8, 19, 37) ve serotip 3, 4 ve 7 neden olur (27). Sporadik vakalara birçok adenovirus serotipi neden olur ve her mevsimde görülebilir. FKA çoğunlukla çocukları etkiler ve sıklıkla serotip 3 ve 7 tarafından oluşturulur (28). EKK'e sıklıkla adenovirus 8, 19 ve 37 neden olur fakat birçok serotipin bu tabloya neden olabildiği bildirilmiştir (28, 29). Ad – 8, 1959 yılında ilk kez bu hastalığın etkeni olarak tanımlandığından beri hastalığın asıl etkeni olarak kalmıştır. Ad-8 hala birçok ülkede EKK tablosunda saptanan predominant serotiptir (2, 30-32). EKK toplum kaynaklı olabileceği gibi, nazokomiyal enfeksiyon olarak da karşımıza çıkabilir (27, 33-35). EKK her yaş grubunda meydana gelebilen ciddi keratokonjonktivit tablosudur ve özellikle hastanelerde olmakla birlikte toplu yaşanan birçok yerde salgınlar şeklinde görülür (27). Hastanelerde meydana gelen

salgınlarda atak hızı %25'i bulur (29). Bu nedenle adenoviruslara bağlı göz enfeksiyonlarının hızlı bir şekilde tanınması ve tedavi edilmesi büyük önem taşır. Hastaların hastanede mümkün olduğunca az süre kalması ve diğer hastalardan izolasyonu sağlanmalıdır.

Bulaşma genellikle insandan insana, sağlık personellerinin elleriyle, kontamine oftalmik aletler ve solüsyonlar ile olur. Enfekte sağlık personeli, rezervuar olarak hastalara enfeksiyonun bulaşmasında rol oynayabilir. Adenoviruslar kontamine cansız yüzeylerde 30 gün süreyle enfeksiyöz olarak kalabilirler. Bu yüzden nozokomiyal salgınlara önlenmesi için cansız yüzeylerin ve oftalmik aletlerin adenovirustan temizlenmesi çok önemlidir. Ayrıca hastaların ve enfekte sağlık personelinin izolasyonu, kişiye özgü / tek kullanımlık damlalıkların kullanımı, gerektiğinde klinik / polikliniğin kapatılması gerekir. Alet dezenfeksiyonunda, sabun ve suyla yıkandıktan sonra 5-10 dakika dezenfektan (%70 etil alkol, 5000 ppm klor) içinde bekletme önerilen yöntemler arasındadır (29).

4.1.5 Adenovirus Enfeksiyonlarında Bağışık Yanıt

Adenoviruslar immün sistemi güçlü bir şekilde uyararak hayat boyu koruma sağlayan immün yanıt açığa çıkarırlar. Direkt olarak virion yüzeyindeki antijenleri hedef alan serotip-spesifik nötralizan antikorlar oluşur (11). Dolaşımdaki nötralizan antikorlar sayesinde semptomlu re-enfeksiyonlara karşı etkili ve uzun süreli bir bağışıklık sağlanır. Normal sağlıklı yetişkinlerde genellikle çeşitli tiplere karşı antikorlar saptanabilir.

Maternal antikorlar genellikle bebekleri ciddi respiratuvar adenovirus enfeksiyonlarına karşı korur. 6-11 aylık bebeklerin % 50'sinde bir veya daha fazla tip adenovirusa karşı antikor pozitifliği bulunur (36).

Gruba özgül antikorlar ise komplemanı bağlayan antikorlardır, koruyucu değildirler ve zamanla azalırlar.

4.2 Adenovirusların Tanısı

Adenovirusların tanısında elektron mikroskopisi (EM), virusun hücre kültüründen izole edilmesi, antikor saptanması, antijen ve nükleik asit aranması kullanılan yöntemlerdir (37, 38). Tanıda altın standart kabul edilen virusun hücre kültüründe izolasyonu bir-iki hafta gibi uzun bir süre alır (39). Bu nedenle günümüzde adenovirusların tanısında sıklıkla diğer yöntemler, özellikle

hızlı ve güvenilir bir tanı yöntemi olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile viral DNA'nın saptanması kullanılmaktadır.

4.2.1 İzolasyon Yöntemleri

İzolasyon yöntemleri virus üzerinde daha ileri çalışmaların yapılabilmesine olanak sağlar ve kabul edilebilir duyarlılığa sahiptir. Bu nedenle tamamlanması 1-2 hafta sürebilecek olan bu yöntem, halen tanıda “altın standart” olarak kabul edilmektedir (7, 40)

Virusların izolasyonu için örnekler, hastalığın erken döneminde, enfeksiyonun görüldüğü bölgelerden alınmalıdır. Farklı hastalık tablolarında adenovirusların çıkartılma süresi değişkendir (36). Örnekler semptomların ortaya çıkışından sonra mümkün olan en kısa zamanda toplanmalı, transport sırasında soğuk (2-8°C) tutulmalıdır.

Göz, akciğer ve üriner sistemden adenovirus izolasyonu tanı koydurucu iken boğazdan izole edilen adenovirus, klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde anlamlıdır. Adenoviruslar, barsak ve lenfoid dokuda uzun süre kalabilir, bu yüzden dışkıdan virus izolasyonu, ancak kişide gastroenterit tablosu bulunması durumunda önemlidir (36).

Tüm örnekler adenoviral kültürler için uygundur fakat enterik adenovirusların hücre kültüründe üretilmesi diğer türlere göre daha zordur. Bu nedenle enterik adenovirusların tanısında kültür dışı yöntemler (EM, antijen saptama) kullanılmaktadır (7, 36). İnsan epitel hücre dizileri adenoviruslar için en uygun hücre dizileridir. Enterik adenoviruslar dışında bütün insan adenovirusları primer insan embriyonik böbrek hücre kültürü (HEK), insan serviks karsinomu (HeLa), insan larinks epidermoit karsinomu (HEp-2) ve insan nazofarinks karsinomu (KB) hücrelerinde replike olup sitopatik etki (CPE) oluşturalırlar. Adenovirus tip 40 ve 41 bazı erken proteinlerini bu hücrelerde sentezleyemedikleri için, Adenovirus tip 40 ve 41'in üretilmesi için, Adenovirus tip 5 genomunun E1A ve E1B bölgelerinin transformasyonuyla elde edilen ve Graham 293 hücre suşu olarak adlandırılan insan embriyonik böbrek hücreleri kullanılmaktadır (41, 42).

Adenoviruslarla enfekte hücrelerde, genişleme, yuvarlaklaşma ve üzüm salkımı şeklinde bir araya toplanma, yani agregasyon tipi sitopatik etkiler meydana gelir (43, 44). Hücre kültürlerinde sitopatik etkinin saptanması, virusun ürediğini gösterir fakat tipini belirlemez.

Üreyen virusun tiplendirilmesi için gruba veya tipe özgül antikorlar kullanılarak nötralizasyon veya floresan antikor testleri uygulanmalıdır.

Hücre kültürlerinde adenovirusların üretilmesi 2-4 hafta sürebilir ve tiplendirme de zaman alıcı ve zahmetlidir. Daha kısa sürede sonuç veren “shell-vial” yöntemi kullanılabilir (45). ‘Shell-vial’ yöntemi ile beş gün içinde pozitif sonuçlar alınabilmektedir (43).

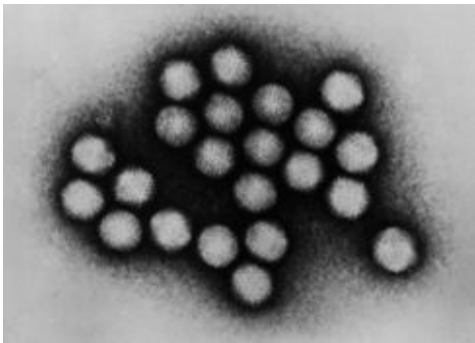
Dezavantajlarına rağmen virusun elde edilmesine, virusun tiplendirilmesine ve virus üzerinde ileri çalışmalara izin verdiği için hücre kültürü, tanıda ‘altın standart’ olarak kabul edilmektedir.

4.2.2 Doğrudan Saptama

4.2.2.1 Mikroskopi

Klinik örnekte adenovirus partikülleri veya hücre çekirdeğinde olgunlaşmış virüslerin oluşturduğu karakteristik yapılar elektron mikroskopisi ile saptanarak daha ileri tanımlamaya gerek kalmadan adenovirus tanısı konabilir. EM özellikle patoloji çalışmalarında doku örneklerinde tanı için kullanılmaktadır.

EM ile incelenecek olan tespit edilmiş doku ince kesitlere ayrılır, negatif boyanır ve sıklıkla çekirdek içinde bulunan virus partiküllerinin kristal dizilimleri incelenir (7). Yavaş hızla santrifüjleme sonrasında elde edilen arındırılmış sıvı da aynı şekilde boyanarak, direkt EM ile partikül kümeleri açısından incelenir.



Şekil 7: Adenovirusun elektron mikroskop görüntüsü (46)

Bu yöntemin duyarlılığı, örnekte bulunan virüs partiküllerinin miktarına bağlı olarak değişir. Virusun EM ile saptanabilmesi için örneğin mililitresinde en az 10^5 - 10^6 virus partikülü olması gerekir (47). Duyarlılığı arttırmak için ultrasantrifüjleme ve diğer konsantrasyon yöntemleri kullanılabilir (7). Kullanılabilecek bir diğer yöntem, immun elektron mikroskopisi (IEM) ile duyarlılığın artırılmasıdır (44). Burada, örnek önce virusa özgül antiserumla muamale edilir, özgül antikörlerin virus partiküllerini agrege etmesi ve böylece daha kolay görünmeleri sağlanır. IEM hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak oküler adenovirus enfeksiyonlarının tanısında önerilmiştir (48).

EM ile hızlı bir şekilde adenovirus tanısı konabilir (49). Fakat EM zahmetli ve pahalı olduğu için pratik kullanımı sınırlıdır. Hücre kültürlerinde üretilmesi zor olan virüslerin klinik örneklerde gösterilmesi amacıyla ya da virus partiküllerinin morfolojisinin incelenmesinde tercih edilen bu yöntem, ancak belirli referans laboratuvarlarında uygulanabilmektedir.

4.2.2.2 Antijen Saptama

Antijen saptama, genellikle solunum yolu enfeksiyonlarının ve gastrointestinal enfeksiyonların tanısında kullanılır. Çoğunlukla hekson proteinin korunan bölgelerine karşı monoklonal antikörler kullanılır. Immunfloresan (IF) veya enzim immunoassay (EIA) temelli, genellikle ticari olarak elde edilebilen testler kullanılır. Bu yöntemler genellikle yeterli duyarlılığa sahiptirler ve hızlı sonuç verirler.

IF çoğunlukla solunum sisteminden virusun saptanması için kullanılır. Posterior nazofarenksten silli kolumnar epitel içeren yıkantı, aspirat veya sürüntü örnekleri alınır. Örnekteki epitel hücreleri lam üzerine çöktürülerek asetonla sabitlenir, işaretli monoklonal antikörler ile boyanır ve floresan mikroskop ile incelenir. Genellikle daha duyarlı olan direkt floresan yöntemleri tercih edilir. Kültür ile karşılaştırıldığında solunum yolu örneklerinde Direkt floresan antikör (DFA) yönteminin duyarlılığı %40-60 arasındadır. Sitosantrifüjleme ile duyarlılık %70'lere çıkarılabilir. Özgüllük birçok çalışmada %99'un üzerinde bildirilmiştir (7). 2004 yılında Rochol ve arkadaşlarının pediatrik hastalarda, 1188 solunum yolu örneği üzerinde ticari bir sistem ile yaptığı DFA testinin, adenovirus saptamadaki duyarlılığı %62.5, özgüllüğü %100 olarak belirlenmiş ve sonuç verme süresi ortalama 4 saat olarak bildirilmiştir (50). Yine Landry ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ortalama sonuç verme süresi 2.25 saat

olarak belirlenmiş fakat daha önceki çalışmalarda da olduğu gibi DFA'nın adenovirusları saptamadaki duyarlılığının kültüre göre çok daha düşük olduğu bildirilmiştir (51). Bu nedenle negatif sonuçların kültür ile doğrulanması önerilmektedir.

DFA'nın diğer dezavantajları, örnekte değerlendirme için yeterli sayıda epitel hücrenin bulunmaması ve değerlendirme için deneyimli personele ihtiyaç duyulmasıdır. Sitosantrifüjlemenin her iki konuda da yararlı olabileceği bildirilmiştir (51). DFA tüm bu dezavantajlarına rağmen hızlı sonuç vermesi, ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle adenovirusların neden olduğu solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında halen önerilmektedir (50, 51).

Antijen saptama yöntemlerinden olan EIA veya lateks aglütinasyon yöntemi genellikle gastroenterit etkeni olan adenovirus tip 40 ve 41'in tanısında kullanılır. EIA bu viruslerin tanısında hızlı, basit ve maliyet etkin bir tanı yöntemidir (38). Bu tiplerin klasik hücre kültüründe üretilmesi zordur. EIA duyarlılığı, EM ve hücre kültürü ile karşılaştırıldığında genellikle %90'nın üzerindedir ve saçılan virus miktarı 10^{10} partikül / gr dışkı olduğunda yeterlidir. Özgüllük ise genellikle %97'nin üzerindedir. İmmun yetmezlikli hastalarda virus saçılımı daha az olabildiği için tanıda PCR yada hücre kültürü gibi daha duyarlı yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (38).

4.2.2.3 Nükleik Asit Saptama Yöntemleri

Çeşitli moleküler yöntemler (Southern blot, dotblot gibi hibridizasyon yöntemleri; PCR, ligaz zincir reaksiyonu gibi amplifikasyon yöntemleri; sekanslama, restriksiyon enzim analizi- REA-gibi DNA dizi inceleme yöntemleri) ile klinik örneklerde adenovirus DNA'sı saptanabilmektedir.

Adenovirusların özellikle immün yetmezlikli hastalarda neden olduğu ciddi enfeksiyonlar nedeniyle daha duyarlı ve hızlı tanı yöntemlerine duyulan gereksinim artmıştır (52). Bunun yanında adenovirusların oftalmik enfeksiyonlarında görülen yüksek bulaşıcılık nedeniyle, etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması salgınların önlenmesi veya sonlandırılması bakımından önem taşımaktadır. PCR ile karşılaştırıldığında konvansiyel yöntemler hız ve duyarlılık

bakımından yetersiz kalmaktadır (52, 53). Bu nedenle son yıllarda adenovirusların tanısında PCR en sık kullanılan yöntem haline gelmiştir (54-56).

Bugüne kadar grup veya tip spesifik primerleri kullanan, korunmuş veya değişken bölgeleri hedef alan birçok PCR temelli test ve bunların klinik uygulamaları tanımlanmıştır (57-59). Adenovirus DNA'sının saptanması yanında, son yıllarda adenovirusların serotiplendirilmesine yönelik artan bir ilgi görülmektedir. Serotiplendirme özellikle epidemiyolojik araştırmalar, patogenezi çalışmaları, ciddi veya olağandışı enfeksiyonlarda önemli olmakla birlikte, spesifik serotiplerin hastalığın türü ve ciddiyeti ile bağlantılı olması serotiplendirmeye olan ihtiyacı arttırmıştır.

Adenoviruslar serolojik ve moleküler olarak tiplendirilebilirler. Nötralizasyon testlerine dayalı serolojik tiplendirme zahmetli ve zaman alıcıdır, tip spesifik serum ve izolata ihtiyaç duyar (52). Moleküler tiplendirme ise hem izolatlara hem de orijinal örneklerle uygulanabilen hızlı ve kolay bir yöntemdir. PCR ve ardından restriksiyon enzim analizi (37, 60) veya dizi analizi (52, 61) ile tiplendirme yapılabilir.

Nükleik asit tabanlı testlerde E1A ve E1B (62), hekson (52, 58, 63) ve fiber (64) bölgelerine yönelik grup veya tip spesifik primerler kullanılmaktadır. Bütün adenovirus serotipleri ile reaksiyon veren hekson primerleri tanısız viroloji laboratuvarlarında en sık kullanılan primerlerdir (44).

Yaklaşık olarak 2.9 kb olan hekson geni, tüm insan adenoviruslarında ortak olan antijenik bölgeler ve ayrıca nötralizan antikorları uyaran tipe özgül bölgeler içerir. Üç farklı segmentten oluşur. Bunlar: santral değişken bölge (yedi çok değişken bölge içerir) ve santral bölgeyi çevreleyen, yüksek düzeyde korunmuş iki bölgedir. Adenovirusun serotip-spesifik sekansları kapsomerdeki heksonların, yedi farklı çok değişken bölgesinde ("Hypervariable Region"-HVR) dağılmış olarak bulunmaktadır (65, 66). Adenovirusların tanısında ve tiplendirilmesinde hekson geninin farklı bölgelerini hedef alan universal, tip-spesifik, tür-spesifik ve kantitatif birçok PCR yöntemi rapor edilmiştir (67).

4.3. Adenovirusların Tiplendirilmesi

4.3.1 Nötralizasyon Testi

Test, bağışık serumlarda bulunan ve virusu nötralize eden antikorlar kullanılarak yapılır. Virusun, özgül antikorların varlığı ve yokluğunda üreme özelliklerine dayalıdır. Hücre kültürü veya deney hayvanları kullanılır. Nötralizasyon testi türe özgüdür. Uygulaması zor ve zaman alıcıdır, fakat nötralizasyon testi serolojik tanıda “altın standart” olarak kabul edilir (7) .

4.3.2 Hemagglütinasyon ve Hemagglütinasyon İnhibisyon Testi

Adenovirus izolatlarının tip spesifik identifikasyonunda önce grup belirlenmelidir. Bunun için hemagglütinasyon testi uygulanır. Daha sonra da spesifik serotiplerin belirlenmesinde hemagglütinasyon inhibisyon testleri ve nötralizasyon testleri yapılabilir. Testin yapılabilmesi için hastalığın akut ve konvalesan dönemlerinde alınmış hasta serumlarına, standart bir eritrosit süspansiyonuna ve titre edilmiş standart antiijenlere ihtiyaç duyulur (68).

4.3.3 Restriksiyon Enzim Analizi

Genomik yapı ve genetik dizilim, virus aileleri, tipleri ve türleri arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılığı DNA'nın restriksiyon endonükleazlar (RE) yardımıyla kesimi ile göstermek mümkündür.

Restriksiyon endonükleazlar, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden veya bu diziler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Aynı RE ile farklı DNA'lar kesildiğinde birbirinden farklı uzunlukta parçalar oluşur. REA, “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) yada “Pulse Field Gel Electrophoresis” (PFGE) gibi nükleik asit tabanlı tiplendirme sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır ve moleküler tiplendirme yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (69)

Son zamanlarda adenovirus serotiplendirilmesini kolaylaştıran, PCR ve REA'ni kombine eden birçok metod tanımlanmıştır (37, 70, 71). Adenovirus tip 43 – 49 ve adenovirus 50 ve 51 bu yöntem sayesinde belirlenebilmiştir (54, 72). Adenovirusların hızlı tiplendirilmesi için kullanılan PCR-REA kombinasyonu ile 51 adenovirus serotipini ve 1, 3, 4, 5, 7, 11, 19, 40 ve 41'e ait 44 farklı varyantı saptamak mümkün hale gelmiştir (37).

4.3.4 Nükleotid Dizi Analizi

DNA dizi analizi (DNA “sequencing”) DNA’nın nükleotid dizilerinin saptanmasını ifade etmektedir. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar, Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ile Sanger’in 2-3 dideoksi enzimatik yöntemidir (73, 74). Sanger’in yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Sanger DNA dizi analizi yönteminde, amplifikasyon ile elde edilmiş tek ipçikli DNA, DNA polimeraz enzimi, dideoksinükleotid (ddNTP) ve deoksinükleotid (dNTP) kullanılır. Substrat olarak deoksiribozun 3' noktasında hidroksil grubu bulundurmeyen ddNTP’ler kullanılır. Sentezlenen DNA iplikçiğine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durur. Kalıp DNA, primer, dNTP ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine farklı bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylece reaksiyon tüplerinde ddNTP’lerin kullanımına bağlı olarak farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşmaktadır. Bu DNA parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek görüntülenmektedir. Uzunluk sırasına göre dizilen parçaların sonunda bulunan ddNTP’ler okunarak hedef nükleotid dizisi çıkarılır. Elde edilen nükleotid dizileri Gen Bankasındaki gruplara özgü gen dizileriyle karşılaştırılarak, eldeki ürünün identifikasyonu yapılır.

Günümüzde otomatik DNA dizi analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Otomatik analizde sıklıkla Sanger’in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemlerinden oluşur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancının yanında, standart çalışma koşulları da sağlamaktadır.

Birçok virus gibi adenovirusların tiplendirilmesinde de DNA dizi analizi, sıklıkla kullanılan moleküler yöntemlerden biri haline gelmiştir. Yapılan X-ray kristalografi ve sekans analizleri adenovirusların hekson bölgesinde yer alan HVR’lerin tip spesifik nötralizasyondan sorumlu olduğunu göstermiş ve birçok çalışma bu bölge üzerine odaklanmıştır (61). Takeuchi ve ark.(61) hekson HVR’lerinin PCR ile amplifikasyonu ve direkt olarak sekanslanmasının, akut keratokonjonktiviti olan hastalardan alınan sürüntülerden, adenovirusların tiplendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiş ve Blasiolo ve ark.(24) bu metodu askeri personelden elde edilen adenovirusların tiplendirilmesinde kullanmıştır. Fakat HVR’ler hekson geninin sürekli olmayan,

büyük bir bölgesini içermektedir ve bu nedenle çok sayıda PCR ve sekans reaksiyonu yapılması gerekmektedir (75). HVR referans sekanslarının bütün adenovirus prototip suşları için bulunmaması da moleküler tiplendirmede bu bölgenin kullanımını sınırlamaktadır.

Son yıllarda hekzon geninin daha kısa bölgelerinin de serotip ile korele olduğu gösterilmiş ve rutin moleküler tiplendirmede kullanımının daha pratik olabileceği öne sürülmüştür. Sarantis ve arkadaşları HVR 7'nin PCR ve sekansına dayalı bir tiplendirme yöntemi tanımlamışlardır (52). Çalışmamızda kullanılan bu yöntem bilinen tüm insan adenoviruslarını saptamakta ve tiplendirebilmektedir.

4.4 Adenovirus Enfeksiyonlarından Korunma ve Tedavi

Korunmada en kolay yol el yıkama gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasıdır. Nozokomiyal salgıların önlenmesi için cansız yüzeylerin ve oftalmik aletlerin adenoviruslardan temizlenmesi çok önemlidir. Hastaların ve enfekte sağlık personelinin izolasyonu, göz polikliniklerinde kişiye özgü / tek kullanımlık damlalıkların kullanılması önerilir. Nozokomiyal bulaş durumunda ilgili klinik / polikliniğin bir süre kapatılması ve dezenfeksiyonu gerekebilir. Kontamine yüzeyler sodyum hipoklorit ile temizlenebilir. Alet dezenfeksiyonunda sabun ve suyla yıkadıktan sonra 5-10 dakika dezenfektan (%70 etil alkol, 5000 ppm klor) içinde bekletme önerilen yöntemler arasındadır.

Adenovirus enfeksiyonlarından korunma amacıyla tip 4 ve tip 7'den hazırlanmış attenüe aşı 1971 yılında kullanıma girmiş ve özellikle askeri personelde kullanılan aşının etkin olduğu gösterilmiştir. Fakat 1996 yılında aşının üretimi durmuş ve kullanımdan kalkmıştır (76)

Adenovirusların tedavisinde etkinliği kesin olarak kabul edilmiş bir antiviral ajan bulunmamaktadır. Birçok nükleozit veya nükleotid analogu invitro olarak etkin bulunmakla birlikte, klinik etkileri tartışmalıdır. Ribavirin ve sidofovir üzerine yapılmış küçük klinik çalışmalar olmakla birlikte, sonuçları tartışmalıdır (11).

İmmüsuprese kişilerde immüsupresyonun azaltılması en etkin yol olarak görünmektedir (44).

5. GEREK VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Çalışma Grubu

Ocak 2006 ve Ağustos 2010 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde yer alan Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarına, Dokuz Eylül Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilimdalı'ndan adenoviral konjonktivit / keratokonjonktivit şüphesi ile 488 konjonktival sürüntü örneği gelmiştir. Bu örneklerden 213 tanesinde (%43.6) Allard ve ark.'nın (37) tanımladığı PCR yöntemi ile adenoviral DNA pozitif bulunmuştur. Bütün pozitif örnekler alikotlanarak -80 °C'de saklanmıştır.

Pozitif bulunan 213 örnekten 101'i (%47.4'ü) genotiplendirme için randomize olarak seçildi ve her hastadan sadece bir örnek çalışmaya dahil edildi.

Çalışma grubunda 69 erkek ve 32 kadın hasta yer aldı. Hastaların yaş ortalaması 28.9 (± 21.9) idi.

5.2 Yöntem

5.2.1 Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu "Nucleic Acid Isolation Kit" ile "MagNA Pure LC" (Roche) cihazında, üreticinin önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

5.2.2 Gerçek Zamanlı PCR ile Adenovirus DNA'sının Kantitasyonu

Heim ve arkadaşlarının (77) çalışmasında tanımlandığı şekilde, hekson genini hedef alan primer ve probler kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyonu "7500 Real Time PCR System" (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Öncül adı	Tip	Dizi (5' - 3')	Referans
Adenoquant 1	sense	GCC-ACG-GTG-GGG-TTT-CTA-AAC-TT	77
Adenoquant 2	antisense	GCC-CCA-GTG-GTC-TTA-CATGCA-CAT-C	77
Adenoprobe	prob	TGC-ACC-AGA-CCC-GGG-CTC-AGGTAC-TCC-GA	77

Tablo 4: Gerçek zamanlı PCR’da kullanılan primer ve proplar

Her reaksiyon 30 mikrolitre (µl) karışım ve 20 µl DNA ile gerçekleştirilmiştir.

Karışım İçeriği (Toplam Hacim 30 µl)

2X TaqMan DNA Master mix	25 µl
Primer/probe mix (10pmol/50 µl sense primer, 45pmol/50 µl antisense primer, 5pmol/50 µl prob).....	1 µl
Distile su	4 µl

5.2.3 Sekans PCR

Sekans PCR için Sarantis ve arkadaşlarının.(52) çalışmasına göre tasarlanmış olan, hekzon geninin HVR-7’yi de içeren 605-629 nükleotidlik bir bölgesini hedef alan primerler kullanıldı. “PCR Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirildi.

Öncül Adı	Tip	Dizi	Referans
AD1	Sense	CTGATGTACTACAACAGCACTGGCAACATGGG	52
AD2	Antisense	GCGTTGCGGTGGTGGTTAAATGGGTTTACGTTGTCCAT	52

Tablo 5 : Sekans PCR’da kullanılan primerler

Her reaksiyon 40 µl karışım ve 10 µl DNA ile gerçekleştirildi.

Karışım İçeriği (Toplam Hacim 40 µl)

10X tampon (Qiagen).....	5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
50X dNTP karışımı (Roche).....	1 µl
Primer 1(20µmol)	1 µl
Primer 2(20µmol)	1 µl
Hot start DNA polimeraz (Qiagen)	0.5 µl
Distile su	29.5µl

Reaksiyonun Isı Döngüsü

95°C’de 15 dakika ön denatürasyon

95°C’de 1dakika denatürasyon

52°C’de 1 dakika birleşme

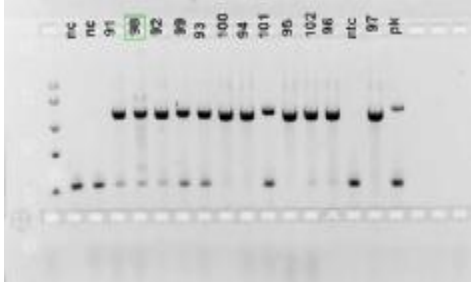
72°C’de 1 dakika uzama

72°C’de 10 dakika son inkübasyon

} 40 döngü

5.2.4 PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

10 µl PCR ürünü ticari olarak satın alınan, etidiyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde (E-Gel, Invitrogen) elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonunda ultraviyole transilluminatörde fotoğraflanarak bant oluşumu değerlendirildi



Şekil 8: Bazı örneklerden elde edilen PCR sonuçlarının jel elektroforez görüntüsü. 91-102 no'lu örneklerde ve pozitif kontrolde beklenen yaklaşık 620 bazlık ampikon görüntülendi.

5.2.5 Sekans Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu sekans PCR'daki primerler kullanılarak, “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirildi.

Her reaksiyon 10 µl karışım ve 1 µl PCR ürünü ile gerçekleştirildi.

Karışım İçeriği (Toplam Hacim 10 µl)

Big Dye Terminator v 3.1 reaksiyon karışımı (Applied Biosystems).....	1 µl
5X sekans tamponu (Applied Biosystem)	1.5 µl
Primer (5pmol)	1 µl
Distile su	6.5 µl

Ürünler “Performa Short Plate (Edge Bio)” ile saflaştırıldıktan sonra, ampikonlar direkt ve iki yönlü olarak “ABI Prism 3130X Genetic Analyser” cihazında sekanslandı.

5.2.6 Sekans Analizi

Elde edilen DNA dizileri “DNASTAR Lasergene 8” programı ile analiz edilerek, “Clustal W Multiple Alignment” yöntemi ile hizalandı. Filogenetik ağaçlar Sarantis ve ark.(52) çalışmasından seçilen referans diziler ve GenBank’tan elde edilen diziler ile “neighbour-joining” metodu (Treecon, v1.3b) kullanılarak çizildi. Filogenetik ağaçların güvenilirliği 1000 tekrardan oluşan“ bootsrap” testi ile incelendi.

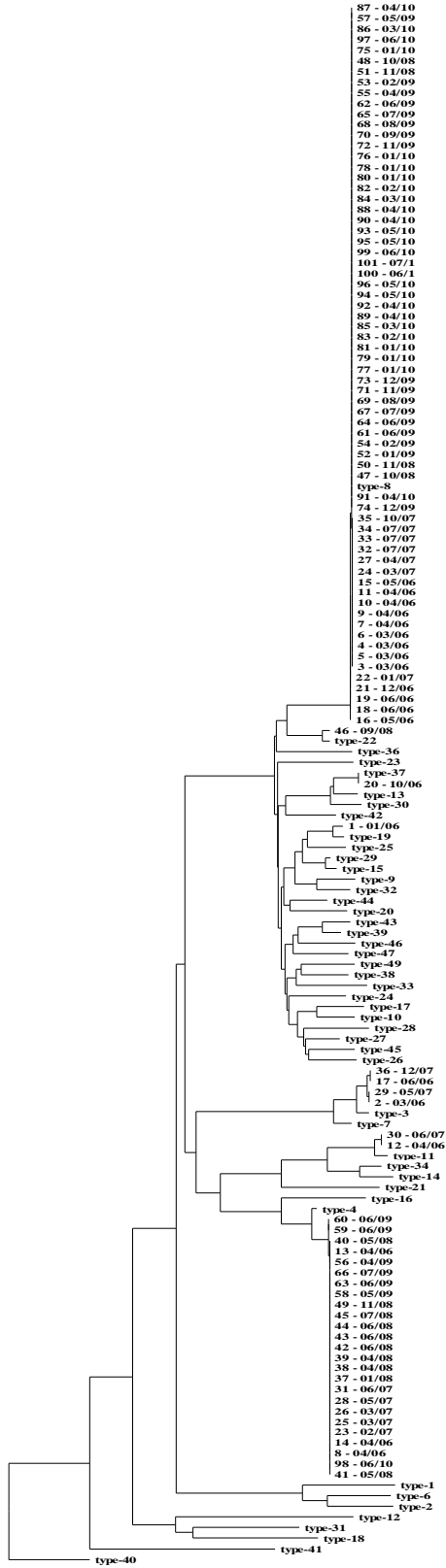
6. BULGULAR

6.1 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

Seçilen 101 örneğin tümünde kantitatif gerçek zamanlı PCR ile adenoviral DNA pozitif bulundu. Örneklerin Ct değerleri 15,42 ile 32,2 arasında idi (ortalama: 22,81 \pm 4,66). Genotip 4 saptanan örneklerin ortalama Ct değeri 20,1376 (\pm 3,44926) iken genotip 8 saptanan örneklerin ortalama Ct değeri 23,3894 (\pm 4,38820) bulundu. Genotip 4 ve 8 saptanan örneklerin Ct değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Mann-Whitney U Test, P<0,001).

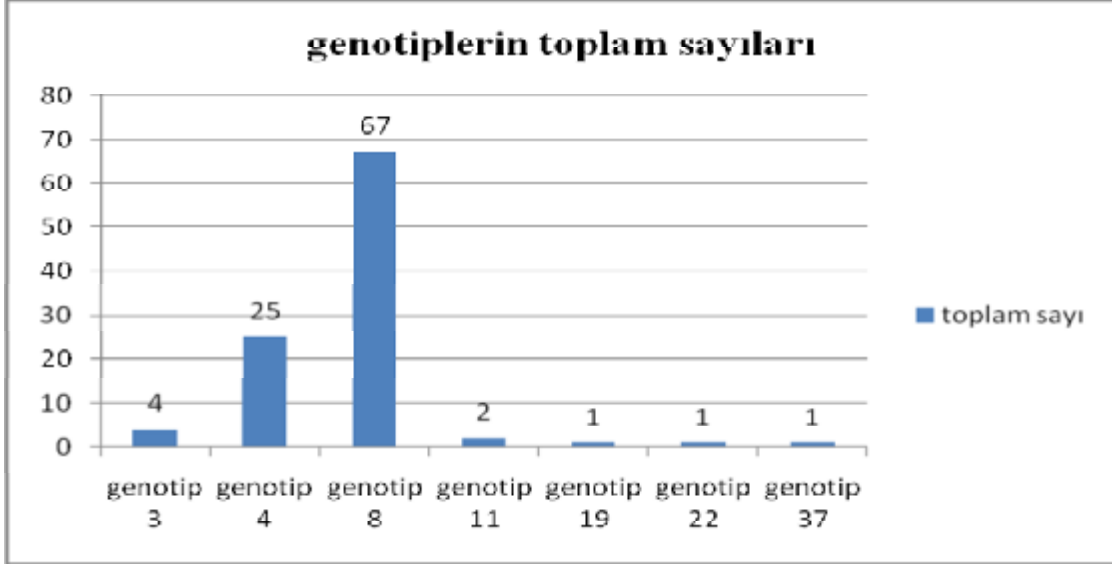
6.2 Sekanlama Sonuçları

Çalışılan örneklerde filogenetik analize göre 3, 4, 8, 11, 19, 22 ve 37 olmak üzere yedi farklı adenovirus genotipi saptandı. Genotiplerin saptanmasında şekil 9'da gösterilen filogenetik ağaç kullanıldı.



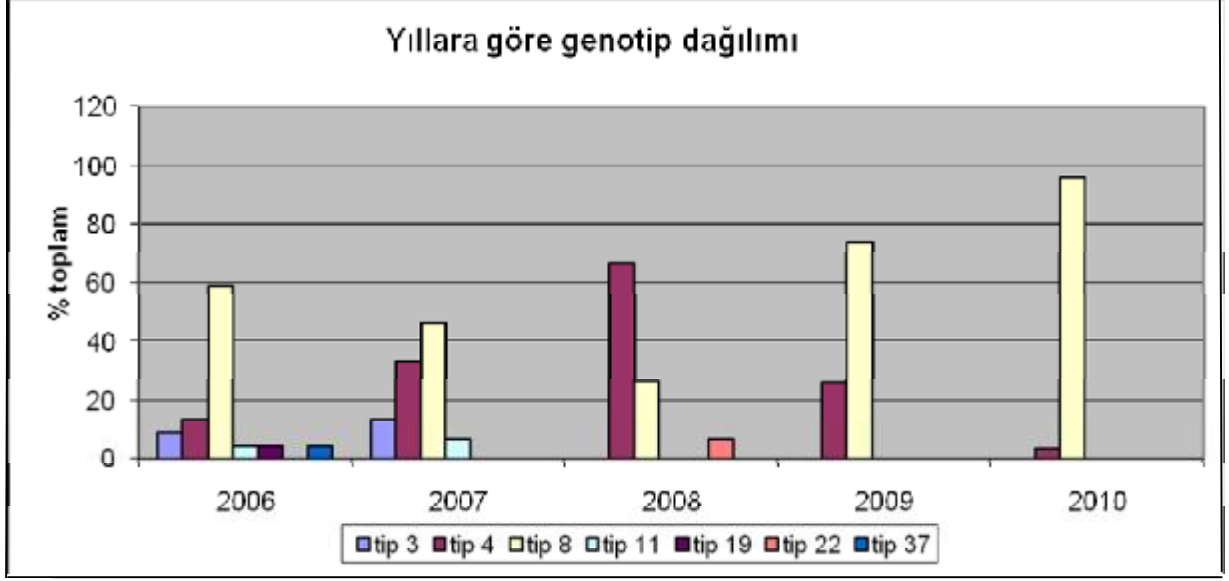
Şekil 9: TREECON (versiyon 1.3b) programı ile “neighbor joining” metodu kullanılarak, ampikonların nükleotid sekansları ile çizilmiş filogenetik ağaç. Prototip suşlar serotip numaraları ile gösterilmiştir. Klinik izolatlar örnek numarası ve izole edildikleri ay / yıl ile gösterilmiştir.

Genotip 8, en sık saptanan genotip olup, 101 örneğin 67'sinde (%66.3) bulundu. Genotip 4, 25 örnek (%24.7) ile ikinci sırada yer alırken diğer 5 genotip (3, 11, 18, 22 ve 37) örneklerin %8.9'undan izole edildi (Grafik 1).



Grafik 1: Saptanan adenovirus genotiplerinin toplam sayıları

Çalışmamıza dahil edilen örneklerin ait oldukları 5 yılda, genotip 4'ün en sık rastlandığı 2008 yılı dışındaki tüm yıllarda genotip 8 en sık saptanan genotiptir. İlk yıllarda saptanan adenovirus genotipleri çeşitlilik gösterirken, yıllar içinde bu çeşitliliğin giderek azaldığı görüldü ve 2010 yılında bir örnek dışında tüm örneklerde genotip 8'e rastlandı (Grafik 2).



Grafik 2: Saptanan adenovirus genotiplerinin yıllara göre dağılımı

Örneklerin %91'inde saptanan genotip 4 ve 8'e 2006, 2007 ve 2010 yıllarında en sık ilkbahar aylarında rastlandı. 2009 yılında izolasyonların yaklaşık yarısı (11/23, %47.8) yaz aylarında, özellikle de Haziran ayında yapıldı (Tablo 6).

	2006		2007		2008		2009		2010	
	tip-4	tip-8	tip-4	tip-8	tip-4	tip-8	tip-4	tip-8	tip-4	tip-8
Kış	0	1	1	1	1	0	0	5	0	9
İlkbahar	3	10	3	2	4	0	2	2	0	13
Yaz	0	2	0	3	3	0	4	7	1	4
Sonbahar	0	0	0	0	1	4	0	3	0	0

Tablo 6: Genotip 4 ve 8'in yıllara ve mevsimlere göre dağılımı

(Kış: Aralık-Ocak-Şubat, İlkbahar: Mart-Nisan-Mayıs, Yaz: Haziran-Temmuz-Ağustos, Sonbahar: Eylül-Ekim-Kasım)

7. TARTISMA

Adenovirüsler tüm dünyada viral keratokonjonktivit etkenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Adenoviral keratokonjonktivitler, sporadik enfeksiyonlar veya toplumda, göz kliniklerinde, yataklı servislerde hızla yayılan ciddi salgınlar şeklinde görülebilirler. Sonuçta, bu enfeksiyonlar, hastaların uzun süre iş yada okuldan uzak kalmasına, kalıcı kornea hasarına ve hastanelerde meydana getirdikleri salgınlarla maddi ve manevi problemlere neden olabilirler (78). Tüm bu nedenlerle adenoviral keratokonjonktivitlerin hızlı bir şekilde tanınması, oluşabilecek salgınlara hazırlıklı olunması ve gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak yayılımın engellenmesi hem toplum sağlığı hem de hastane enfeksiyonları açısından büyük önem taşımaktadır (79, 80).

Epidemiyolojik çalışmalar, toplumda dolaşan adenovirüs genotiplerinin belirlenmesi ve salgınların mevsimsel özelliklerinin saptanması konusunda veri sağlayarak salgınlara ilişkin önlemlerin alınmasına yardımcı olmaktadır. Japonya ve Amerika gibi bazı ülkelerin bu konuda ulusal sürveyans programları bulunmaktadır (81-83). Bunun yanında özellikle son yıllarda, tüm dünyadan oküler adenovirüs enfeksiyonlarında saptanan genotipler ile ilgili moleküler çalışmaları içeren birçok yayın yapılmıştır (32, 84, 85).

Türkiye’de keratokonjonktivite neden olan adenovirüs genotipleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yağcı ve arkadaşlarının (86) 2003-2004 yıllarında toplanmış dokuz adet olguya ait çalışması ile Ersoy ve arkadaşlarının (87) neonatal yoğun bakım ünitesinde meydana gelen adenoviral konjonktivit salgınına ilişkin 14 olguya ait sekans analizi bu alandaki nadir yayınlardır.

Çalışmamızda, 2006-2010 yılları arasında merkeimizdeki adenoviral keratokonjonktivit prevalansı ve genotip dağılımı saptanmıştır. Çalışmamız, örnek sayısı ve incelenen yıllar bakımından Türkiye’de adenoviral keratokonjonktivitler konusunda bugüne kadar yapılmış olan en kapsamlı çalışmadır. Yaklaşık beş yıllık bir dönemde (Ocak 2006 – Ağustos 2010) viral etiyojoloji ön tanısı ile incelenmesi istenen 488 konjonktival sürüntü örneğinin yarıya yakınında (n:213, %43.6) adenovirüs DNA’sı pozitif bulunmuştur. Adenovirüsler, çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda da viral keratokonjonktivit etkenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (1, 81). A.B.D’nin Florida eyaletinde viral oküler enfeksiyonları inceleyen bir çalışmada, 1987 – 2001

yılları arasında toplanan 1964 örnekte konjonktivadan izole edilen viral etkenler arasında adenovirusların ilk sırada yer aldığı (%66) saptanmıştır (88). Japonya'nın ulusal surveyans programında yer alan 2007 – 2011 yılları arasındaki raporlara göre de, adenoviruslar EKK etkenleri arasında ilk sırada gelmektedir (89).

Çalışmamızda adenoviral DNA pozitif saptanan örneklerin yaklaşık yarısı (n:101) randomize olarak seçilerek sekans analizi ile genotiplendirilmiştir. Genotip 8 en sık saptanan (%66.3) genotiptir. İkinci ve üçüncü en sık saptananlar ise sırası ile genotip 4 (%24.7) ve genotip 3 (%4) olmuştur (Grafik 1). Literatürde göz enfeksiyonlarına neden olan adenovirus genotiplerine ilişkin çalışmalarda ülkeler, bölgeler ve yıllar arasında farklılıklar görülmekle birlikte en sık rastlanan genotipler 3, 4, 8, 19 ve 37'dir (3, 90). Çalışmamızın bulguları bu veriler ile uyumludur. Bu tipler arasında. genotip 8, 1959 yılında ilk izole edildiğinden beri EKK'e neden olan temel ajandır. Konjonktival epitele olan tropizmi daha fazladır ve ciddi klinik, patolojik bulgulara neden olmaktadır (85). Bu genotipin toplumda sebat ettiği, oküler muayene araçları ile taşınabildiği ve birçok ülkede sporadik veya nazokomiyal salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (91-96).

Japonya ulusal sürveyans programının 2005-2006 verilerine göre adenoviral EKK etkenleri arasında tip 2, 3, 4, 8, 11, 19 ve 37'ye rastlanmıştır; 3 ve 8'in baskın olduğu bildirilmiştir (89) Aynı yıllar arasında Tokyo'dan yapılan bir çalışmada genotip 3, 8 ve 11'in en çok saptanan genotipler olduğu rapor edilmiştir (97). Meksika'dan 2005-2006 (84) ve Norveç'ten 1989-1996 yılları arasındaki adenoviral olguları değerlendiren (32) çalışmalarda değişik genotipler saptanmış, salgınlarda ise genotip 8'in baskın olduğu bildirilmiştir. Macaristan'dan 2006 yılında genotip 8'in neden olduğu bir salgın bildirilmiştir (98). Suudi Arabistan'da 2002-2007 yılları arasında toplanan 65 örneğin incelendiği çalışmada genotip 8 örneklerin %67'sinde saptanmıştır (99). Ülkemize coğrafi açıdan yakın olan Yunanistan'ın Selanik şehrinde, 1998-2000 yılları arasında sporadik vakalardan izole edilen 10 adenovirus'un 4'ünde genotip 8'e, 4'ünde genotip 4'e rastlanmıştır (85). Aynı çalışmada 2002 yılında meydana gelen bir salgın sırasında izole edilen 19 adenovirusun 18'inin genotip 8 olduğu belirlenmiştir. Tüm bu çalışmalar daha önce de belirtildiği gibi yıllar ve ülkelere göre genotiplerin değişebildiğine fakat salgınlarda sıklıkla genotip 8'e rastlandığına dikkat çekmektedir. Genotip 8, çalışmamızda 2008 yılı dışında tüm

yıllarda en sık rastlanan genotip olmuş; 2010 yılında izole edilen 27 örneğin 26'sında saptanmıştır. Bu veriler, merkemize başvuran olgular açısından, 2010 yılında genotip 8'e bağlı bir salgın yaşandığını düşündürmektedir. Ülkemizden Yağcı ve arkadaşlarının Ankara'da yaptıkları çalışmada dokuz örnekte genotip 3, 4 ve 8'e rastlanmış ve genotip 8'in baskın olduğu bildirilmiştir. Malatya'dan bir neonatal yoğun bakım ünitesindeki salgına ait 16 örneğin, 15'inde adenoviral DNA pozitif bulunmuş; bunlardan 14'ünün genotip 8 olduğu belirlenmiştir .Az sayıdaki örnekle ve sınırlı bir bölgede yapılmış olan bu çalışmalardan ülkemizle ilgili çıkarımlar yapmak mümkün değildir. Ülkemiz yada bölgemizdeki populasyonda dolaşan adenovirus genotiplerini ve varsa salgınları belirleyebilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda tip 4, örneklerin %24.7'sinde saptanarak ikinci en sık saptanan genotip olmuştur. Genotip 4 adenoviral konjonktivitlerde sık rastlanan bir ajandır ve Asya, Avrupa ve Avustralya'dan salgınları rapor edilmiştir (100-102).

Çalışmamızdaki genotiplerin yıllara göre dağılımına bakıldığında 2006 ve 2007 yıllarında genotip 8 baskın olmakla birlikte, genotip çeşitliliği olduğu belirlenmiştir. Genotip 4'ün oranının 2006 yılından itibaren giderek arttığı, 2008 yılında baskın tip haline geldiği, izleyen yıllarda ise oranının giderek azaldığı gözlenmiştir. Genotip 8 ise genotip 4'ün baskın olduğu 2008 yılı dışındaki tüm yıllarda en sık izole edilen genotip olmuş, 2010 yılında ise bir örnek dışında tüm izolatların genotip 8 olduğu görülmüştür. Bu veriler genotip 8'in toplumda sebat ettiği ve zaman zaman hastane ve / veya toplum kaynaklı salgınlar yaptığı bilgisini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda elde edilen genotip 4 ve 8 dizileri ile, "GenBank"da bulunan, dünyanın farklı bölgelerinden ve konjonktival örneklerden elde edilmiş genotip 4 ve genotip 8 dizilerinin ilişkisini araştırmak amacıyla filogenetik değerlendirmeler yapılmıştır (sonuçlar sunulmamıştır). Ancak çalışmadaki hedef bölge olan hekson geninin HVR-7 bölgesini içeren viral DNA fragmanına ait dizilerin bu tür bir incelemeye izin verecek yeterli farklılığa sahip olmadığı görülmüştür. Mizuta ve ark. yaptıkları çalışmada, HVR'lerin serotipe özgü korunmuş bölgeler olduğunu belirlemişler ve bu bölgeleri "serotip-spesifik bölgeler" olarak isimlendirmeyi önermişlerdir (103). Bu veriler ışığında, bu gen bölgesi kullanılarak bir salgın analizi de yapılamayacağı öngörülebilir.

Çalışmamızda kantitatif bir yöntem ve buna uygun örnek tipi kullanılmamasına rağmen, en sık saptanan genotip 4 ve 8 örneklerinin ortalama Ct değerleri karşılaştırılarak viral yük hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Genotip 8 örneklerine ait ortalama Ct değerleri, genotip 4 örneklerine ait ortalama Ct değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Aradaki fark 3.2 Ct olup, yaklaşık 1 log₁₀ kopya/ml'ye karşılık gelmektedir. Literatürde keratokonjonjoktivit örneklerinde genotip-viral yük ilişkisine ait bilgi bulunmamakla birlikte, genotip 8'in daha bulaşıcı ve patojen olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle genotip 8 saptanan örneklerde daha yüksek viral yük olabileceğini öngörmüş olmamıza rağmen verilerimiz bu hipotezi desteklememiştir. Bunda çalışmanın yöntemine ilişkin eksiklikler rol oynamış olabilir.

Çalışmamızda örneklerin %91'inde saptanan genotip 4 ve 8'e 2006, 2007 ve 2010 yıllarında en sık ilkbahar aylarında rastlanmıştır. 2009 yılında izolasyonların yaklaşık yarısı (%47.8) yaz aylarında, özellikle de Haziran ayında gerçekleşmiştir (Tablo 7). Mevsimsel patternlerin viral serotiplere ve çalışma grubuna bağlı olduğu bildirilmekle birlikte, Florida'da adenoviral konjonktivitelere en çok yaz ve sonbahar aylarında rastlandığı rapor edilmiştir (88). Japonya'dan yapılan çalışmalarda ve ulusal sürveyans programının raporlarında değişik veriler olmakla birlikte enfeksiyonların daha çok bahar ve yaz aylarında olduğu görülmektedir (97, 104). Çalışmamız bu verilerle benzer sonuçlar vermiş, enfeksiyonlar yıl boyu saptanabilmekle birlikte ağırlıklı olarak bahar ve yaz aylarında görülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamız Türkiye'deki adenoviral göz enfeksiyonları ile ilgili olarak yapılmış olan ilk kapsamlı çalışmadır. 2006-2010 yıllarına ait 101 örneğin incelendiği çalışmada genotip 8'in baskın olduğu, onu genotip 4'ün izlediği görülmüştür. Saptanan diğer genotipler ise 3, 19, 22 ve 37'dir. Çalışmamızın kısıtlılıkları, örneklerin İzmir'de tek bir merkezden toplanmış olması ve hastaneye başvuran olguları değerlendirmesidir. Bölgemiz ve ülkemizdeki adenoviruslara bağlı göz enfeksiyonlarının epidemiyolojisi hakkında bilgi edinmek için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Romanowski EG, Yates KA, Gordon YJ. The in vitro and in vivo evaluation of ddC as a topical antiviral for ocular adenovirus infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50: 5295-5299
2. Chang C, Sheu M, Chen C, Lin K, et al. Epidemic keratoconjunctivitis caused by a new genotype of adenovirus type 8 (Ad8)-a chronological review of Ad8 in Southern Taiwan. *Jpn J Ophthalmol.* 2001;45: 160-166
3. Kowalski RP, Karenchak LM, Romanowski EG, Gordon YJ. Evaluation of the shell vial technique for detection of ocular adenovirus. *Community Ophthalmologists of Pittsburgh, Pennsylvania. Ophthalmology.* 1999;106: 1324-1327
4. Goncalves MA, de Vries AA. Adenovirus: from foe to friend. *Rev Med Virol.* 2006;16: 167-186
5. <http://www.wikimedia.org/wiki/Category:Adenovirus> (Erişim tarihi : 11/04/2012)
6. Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol.* 2006;2: 137-143
7. Murray PR, Jorgensen HJ, Baron JE, Pfaller MA. *Klinik Mikrobiyoloji. Atlas Kitapçılık.*2009;2: 1589-1600
8. Fields BN, Knipe, D.M. and Howley, P.M. *Fields Virology.* Lippincott Williams&Wilkins. 2007; 2395-2437
9. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81: 2573-2604
10. Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, et al. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol.* 2007;45: 958-967

11. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol.* 2008;18: 357-374
12. Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist.* 2002;7: 46-59
13. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2004;15: 1022-1033
14. Mul YM, Verrijzer CP, van der Vliet PC. Transcription factors NFI and NFIII/oct-1 function independently, employing different mechanisms to enhance adenovirus DNA replication. *J Virol.* 1990;64: 5510-5518
15. Brenkman AB, Breure EC, van der Vliet PC. Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer. *J Virol.* 2002;76: 8200-8207
16. Leegwater PA, Rombouts RF, van der Vliet PC. Adenovirus DNA replication in vitro: duplication of single-stranded DNA containing a panhandle structure. *Biochim Biophys Acta.* 1988;951: 403-410
17. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, et al. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol.* 1996;70: 2296-2306
18. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş Kitabevi. 2004; 29-30
19. <http://www.klinikmikrobiyoloji.com/indir/adenovirusvepoxviruslar.pdf> (Erişim tarihi 22/03/2012)
20. Matsui K, Saha S, Saitoh M, Mizuki N, et al. Isolation and identification of adenovirus from conjunctival scrapings over a two-year period (between 2001 and 2003) in Yokohama, Japan. *J Med Virol.* 2007;79: 200-205

21. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9: 247-262
22. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol.* 1983;117: 455-466
23. Kolavic-Gray SA, Binn LN, Sanchez JL, Cersovsky SB, et al. Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin Infect Dis.* 2002;35: 808-818
24. Blasiolo DA, Metzgar D, Daum LT, Ryan MA, et al. Molecular analysis of adenovirus isolates from vaccinated and unvaccinated young adults. *J Clin Microbiol.* 2004;42: 1686-1693
25. Chmielewicz B, Benzler J, Pauli G, Krause G, et al. Respiratory disease caused by a species B2 adenovirus in a military camp in Turkey. *J Med Virol.* 2005;77: 232-237
26. Jalal H, Bibby DF, Tang JW, Bennett J, et al. First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 2575-2580
27. Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, et al. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46: 2002-2008
28. 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 Sao Paulo.* 2009;51: 227-229
29. Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, et al. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50: 1419-1424
30. Jin XH, Ishiko H, Nguyen TH, Ohguchi T, et al. Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnam. *Am J Ophthalmol.* 2006;142: 1064-1066

- 31.** Robinson CM, Shariati F, Gillaspay AF, Dyer DW, et al. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37: new insights into corneal tropism. *BMC Genomics*. 2008;9: 213
- 32.** Vainio K, Borch E, Bruu AL. No sequence variation in part of the hexon and the fibre genes of adenovirus 8 isolated from patients with conjunctivitis or epidemic keratoconjunctivitis (EKC) in Norway during 1989 to 1996. *J Clin Pathol*. 2001;54: 558-561
- 33.** Aoki K, Ishiko H, Konno T, Shimada Y, et al. Epidemic keratoconjunctivitis due to the novel hexon-chimeric-intermediate 22,37/H8 human adenovirus. *J Clin Microbiol*. 2008;46: 3259-3269
- 34.** Tanaka-Yokogui K, Itoh N, Usui N, Takeuchi S, et al. New genome type of adenovirus serotype 19 causing nosocomial infections of epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *J Med Virol*. 2001;65: 530-533
- 35.** Kaneko H, Maruko I, Iida T, Ohguchi T, et al. The possibility of human adenovirus detection from the conjunctiva in asymptomatic cases during nosocomial infection. *Cornea*. 2008;27: 527-530
- 36.** Brooks GF, Carroll KC, Butel SJ, Morse AS. *Jawetz, Melnick ve Adelberg Tibbi Mikrobiyoloji*. Lange. Nobel Tıp Kitabevleri. 2010; 419-427.
- 37.** Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 498-505.
- 38.** Terletskaia-Ladwig E, Leinmuller M, Schneider F, Meier S, et al. Laboratory approaches to the diagnosis of adenovirus infection depending on clinical manifestations. *Infection*. 2007;35: 438-443
- 39.** Kowalski RP, Gordon YJ. Comparison of direct rapid tests for the detection of adenovirus antigen in routine conjunctival specimens. *Ophthalmology*. 1989;96: 1106-1109

- 40.** Percivalle E, Sarasini A, Torsellini M, Bruschi L, 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: 257-264
- 41.** Takiff HE, Straus SE, Garon CF. Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet.* 1981;2: 832-834
- 42.** Shinozaki T, Araki K, Ushijima H, Fujii R, et al. Use of Graham 293 cells in suspension for isolating enteric adenoviruses from the stools of patients with acute gastroenteritis. *J Infect Dis.* 1987;156: 246
- 43.** Wood SR, Sharp IR, Caul EO, Paul I, et al. Rapid detection and serotyping of adenovirus by direct immunofluorescence. *J Med Virol.* 1997;51: 198-201
- 44.** Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* 2003;13: 155-171
- 45.** Fields BN, Knipe, D.M. and Howley, P.M. *Fields Virology.* Lippincott Williams&Wilkins. 2007; 2395-2437
- 46.** <http://pathmicro.med.sc.edu/adenocdc.jpg> (Erişim tarihi : 09 / 04 / 2012)
- 47.** Ustaçelebi Ş. Genel Viroloji. Güneş Kitabevi. 2008; 229-230.
- 48.** Van Rij G, Klepper L, Peperkamp E, Schaap GJ. Immune electron microscopy and a cultural test in the diagnosis of adenovirus ocular infection. *Br J Ophthalmol.* 1982;66: 317-319
- 49.** Suparno C, Milligan DW, Moss PA, Mautner V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma.* 2004;45: 873-885
- 50.** Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, et al. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics.* 2004;113: 51-56

- 51.** Landry ML, Ferguson D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 708-711
- 52.** Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, et al. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol.* 2004;42: 3963-3969
- 53.** Madisch I, Wolfel R, Harste G, Pommer H, et al. Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol.* 2006;78: 1210-1217
- 54.** Echavarria MS, Ray SC, Ambinder R, Dumler JS, et al. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 686-689
- 55.** Echavarria M, Forman M, van Tol MJ, Vossen JM, et al. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet.* 2001;358: 384-385
- 56.** Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3: 79-86
- 57.** Avellon A, Perez P, Aguilar JC, Lejarazu R, et al. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2001;92: 113-120
- 58.** Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, et al. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 3323-3326
- 59.** Dalapathy S, Lily TK, Roy S, Madhavan HN. Development and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of adenovirus from conjunctivitis specimens. *J Clin Virol.* 1998;11: 77-84

60. Adrian T, Sassinek J, Wigand R. Genome type analysis of 480 isolates of adenovirus types 1, 2, and 5. *Arch Virol.* 1990;112: 235-248
61. Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, et al. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 1839-1845
62. 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;37: 149-157
63. Pring-Akerblom P, Adrian T. Type- and group-specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. *Res Virol.* 1994;145: 25-35
64. Xu W, Erdman DD. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7, and 21 by a multiplex PCR assay. *J Med Virol.* 2001;64: 537-542
65. Imai Y, Kameya S, Ohkoshi M, Yamaki K, et al. Identification of the hexon region of an adenovirus involved in a new outbreak of keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol.* 2001;39: 2975-2977
66. Takeuchi S, Oshima A, Itoh N, Kitamura N, et al. Analysis of adenovirus type 7 hexon hypervariable region. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 1998;102: 570-575
67. Okada M, Ogawa T, Kubonoya H, Yoshizumi H, et al. Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene. *Arch Virol.* 2007;152: 1-9
68. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T., Cengiz TA, ve ark. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi.* 1999; 807-815
69. Pingoud A, Alves J, Geiger R. Restriction enzymes. *Methods Mol Biol.* 1993;16:107-200
70. Kidd AH, Jonsson M, Garwicz D, Kajon AE, et al. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34: 622-627

- 71.** Allard A, Kajon A, Wadell G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1994;44: 250-257
- 72.** Richmond SJ, Wood DJ, Bailey AS. Recent respiratory and enteric adenovirus infection in children in the Manchester area. *J R Soc Med.* 1988;81: 15-18
- 73.** Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74: 560-564
- 74.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74: 5463-5467
- 75.** 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
- 76.** Kajon AE, Moseley JM, Metzgar D, Huong HS, et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 4 infections in US military recruits in the postvaccination era (1997-2003). *J Infect Dis.* 2007;196: 67-75
- 77.** 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: 228-239
- 78.** Butt AL, Chodosh J. Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea.* 2006;25: 199-202
- 79.** Melendez CP, Florentino MM, Martinez IL, Lopez HM. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus in medical residents. *Mol Vis.* 2009;15:557-562
- 80.** Cheung D, Bremner J, Chan JT. Epidemic kerato-conjunctivitis--do outbreaks have to be epidemic? *Eye (Lond).* 2003;17: 356-363
- 81.** Aoki K, Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Int Ophthalmol Clin.* 2002;42: 49-54

- 82.** Gray GC, Chorazy ML. Human adenovirus 14a: a new epidemic threat. *J Infect Dis.* 2009;199: 1413-1415
- 83.** Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis.* 2007;45: 1120-1131
- 84.** Mejia-Lopez H, Santacruz-Valdes C, Matias-Florentino M. Genetic characterization of adenovirus isolated from follicular conjunctivitis and epidemic keratoconjunctivitis in a group of Mexican patients. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008;83: 161-167
- 85.** Frantidou F, Pavlitou A, Mataftsi A, Dumaidi K, et al. Molecular epidemiology of adenovirus strains isolated from patients with ocular disease in the area of Thessaloniki, Greece (1998-2002). *J Med Virol.* 2005;75: 440-446
- 86.** Yagci R, Akcali A, Yagci S, Konno T, et al. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20: 669-674
- 87.** Ersoy Y, Otlu B, Turkcuoglu P, Yetkin F, et al. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2012;80: 144-149
- 88.** Marangon FB, Miller D, Alfonso E. Laboratory results in ocular viral diseases: implications in clinical-laboratory correlation. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70: 189-194
- 89.** <http://idsc.nih.gov/iasr/prompt/graph/data11.41e.pdf>. (Erişim tarihi : 22/03/2012).
- 90.** Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, et al. Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect.* 2008;68: 262-268

- 91.** Adhikary AK, Numaga J, Kaburaki T, Kawashima H, et al. Genetic characterisation of adenovirus type 8 isolated in Hiroshima city over a 15 year period. *J Clin Pathol.* 2003;56: 120-125
- 92.** Tanaka K, Itoh N, Saitoh-Inagawa W, Uchio E, et al. Genetic characterization of adenovirus strains isolated from patients with acute conjunctivitis in the city of Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2000;61: 143-149
- 93.** Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, et al. Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: risk factors and control. *J Infect Dis.* 1993;167: 1307-1313
- 94.** Sendra-Gutierrez JM, Martin-Rios D, Casas I, Saez P, et al. An outbreak of adenovirus type 8 keratoconjunctivitis in a nursing home in Madrid. *Euro Surveill.* 2004;9: 27-30
- 95.** Kemp MC, Hierholzer JC. Three adenovirus type 8 genome types defined by restriction enzyme analysis: prototype stability in geographically separated populations. *J Clin Microbiol.* 1986;23: 469-474
- 96.** Chastel C, Adrian T, Demazure M, Legrand-Quillien MC, et al. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of adenovirus 8 keratoconjunctivitis. *J Med Virol.* 1988;24: 199-204
- 97.** Matsui K, Shimizu H, Yoshida A, Nagaoka E, et al. Monitoring of adenovirus from conjunctival scrapings in Japan during 2005--2006. *J Med Virol.* 2008;80: 997-1003
- 98.** Reuter G, Meleg E, Kiss G, Albert N, et al. Molecular detection of adenovirus type-8 epidemic keratoconjunctivitis in Hungary. *Orv Hetil.* 2007;148: 1311-1315
- 99.** Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, Akanuma M, et al. Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis.* 2010;16:2132-2136
- 100.** Aoki K, Kato M, Ohtsuka H, Ishii K, et al. Clinical and aetiological study of adenoviral conjunctivitis, with special reference to adenovirus types 4 and 19 infections. *Br J Ophthalmol.* 1982;66: 776-780

- 101.** Cooper RJ, Bailey AS, Killough R, Richmond SJ. Genome analysis of adenovirus 4 isolated over a six year period. *J Med Virol.* 1993;39: 62-66
- 102.** Schepetiuk SK, Norton R, Kok T, Irving LG. Outbreak of adenovirus type 4 conjunctivitis in South Australia. *J Med Virol.* 1993;41: 316-318
- 103.** Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, et al. Stability of the seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res.* 2009;140: 32-39
- 104.** Saitoh-Inagawa W, Aoki K, Uchio E, Itoh N, et al. Ten years' surveillance of viral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999;237: 35-38