

# Klinik Örneklerden İzole Edilen Adenovirusların PCR ve DNA Dizi Analizi Yöntemiyle Tiplendirilmesi

## Molecular Typing of Adenoviruses Isolated from Clinical Specimens by PCR and DNA Sequencing Methods

Candan ÇİÇEK<sup>1</sup>, Tamer ŞANLIDAĞ<sup>2</sup>, Sinem AKÇALI<sup>2</sup>, Murat SAYAN<sup>3</sup>,  
Mehmet YALAZ<sup>4</sup>, Dilek Yeşim METİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>1</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

<sup>2</sup> Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>2</sup> Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Turkey.

<sup>3</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

<sup>3</sup> Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

<sup>4</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>4</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İzmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 04.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.07.2012

### ÖZET

Adenoviruslar, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları (sırasıyla ÜSYE ve ASYE), konjunktivit, gastroenterit ve hemorajik sistit gibi çeşitli enfeksiyon hastalıklarının etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen adenovirusların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 01 Ocak 2011-31 Mayıs 2011 tarihleri arasında rutin viroloji laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden (295 nazofarengeal sürüntü, 42 konjunktival sürüntü, 13 dışkı) izole edilen 22 adenovirus (AdV) suşu dahil edilmiştir. Pozitif örnekler (14 nazofarengeal sürüntü, 7 konjunktival sürüntü, 1 dışkı), ASYE (n= 8), ÜSYE (n= 6), konjunktivit (n= 7) ve gastroenterit (n= 1) klinik tablolarıyla başvuran sekizi erişkin (dördü erkek; medyan yaş: 32.5 yıl), 14'ü çocuk (yedisi erkek; medyan yaş: 1 yıl) hastaya aittir. Hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemiyle izole edilen ve direkt immünfloresan antikor yöntemiyle tanımlanan AdV pozitif örnekler, hekson geninin "hipervariable region 1-6"yı hedefleyen PCR ve DNA dizi analizi yöntemiyle tiplendirilmiştir. Viral DNA amplifikasyonu Lu ve Erdman'ın tanımladığı PCR primerleri (Adhex F1, Adhex R1) kullanılarak yapılmış; ilk reaksiyonda dizi analizi için yeterli ürün elde edilmediğinde Adhex F2 ve Adhex R2 primerleri ile "nested" PCR uygulanmıştır. Dizi analizi, amplifikasyon primerleri ve Sequence Reagent Mix-DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kiti (Amersham Pharmacia Biotech Inc, ABD) kullanılarak ABI PRISM 310

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Dilek Yeşim Metin, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 2996, **E-posta (E-mail):** dilekyesimb@yahoo.com

Genetic Analyzer cihazında (Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen AdV DNA dizilerinin BLAST analiziyle tiplendirilmesi sonunda, serotip 3, 4 ve 8 olmak üzere üç farklı tip saptanmıştır. Çalışmamızda, biri gastroenterit, altısı ÜSYE ve ASYE olan toplam 7 (%31.8) hastanın AdV tip 3; yedisi konjunktivit, beşi ÜSYE ve ASYE olan toplam 12 (%54.5) hastanın AdV tip 8; biri ÜSYE ve ikisi ASYE olan 3 (%13.7) hastanın ise AdV tip 4 ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, AdV tip 8, konjunktivit ve ÜSYE olan hastalarda, AdV tip 3 ise ASYE olan hastalarda en sık saptanan tipler olmuştur. Adenovirüslerin moleküler tiplendirmesinde BLAST analizinin en uygun yöntemlerden birisi olduğu düşünülmüştür. Ülkemizde, daha fazla örnek sayısı ile adenovirus enfeksiyonlarında tiplerin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması, ulusal epidemiyolojik verilerin birikmesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Adenovirus; DNA dizi analizi; moleküler tiplendirme.

## ABSTRACT

Adenoviruses are responsible for a broad spectrum of diseases, including upper and lower respiratory tract infections (URTIs and LRTIs, respectively), conjunctivitis, gastroenteritis, and hemorrhagic cystitis. The aim of this study was to determine the adenovirus (AdV) types isolated from clinical specimens by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing methods. A total of 22 AdV strains isolated between January 1<sup>st</sup> 2011 to May 31<sup>th</sup> 2011, from various samples (295 nasopharyngeal swabs, 42 conjunctival swabs, 13 stool) sent to our routine virology laboratory were included in the study. Of the 22 patients whose samples yielded adenovirus positivity, 8 were adult (4 were male; median age: 32.5 years) and 14 (7 were male; median age: 1 year) were children. Those specimens (14 nasopharyngeal swabs, 7 conjunctival swabs, 1 stool) were obtained from patients with URTIs (n= 6), LRTIs (n= 8), conjunctivitis (n= 7) and gastroenteritis (n= 1). For the isolation and identification of adenoviruses, rapid (shell vial) cell culture and direct immunofluorescence antibody methods were used, respectively. Molecular typing of adenoviruses were performed by PCR and sequencing of a partial region (hypervariable region 1-6) of the hexon gene. PCR primers (Adhex F1, Adhex R1) used for DNA amplification were from those described by Lu and Erdman, previously. If insufficient DNA was amplified from the first reaction for sequencing, a nested PCR was performed using Adhex F2 and Adhex R2 primers. Sequencing was performed using the amplification primers and Sequence Reagent Mix-DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA) on ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Obtained adenovirus sequences were typed by BLAST analysis and three AdV types namely type 3, 4, and 8 were identified. In our study, AdV type 3 was detected in a gastroenteritis case and six cases with URTIs and LRTIs (n= 7, 31.8%). AdV type 8 was identified as the cause of conjunctivitis in seven patients and of URTIs and LRTIs in five patients (n= 12, 54.5%). AdV type 4 was found to be associated with URTI in one, and LRTIs in two patients (n= 3; 13.7%). Our data indicated that AdV type 8 was the most prevalent type in patients with conjunctivitis and URTIs, while AdV type 3 was the most prevalent type in patients with LRTI. BLAST analysis was thought to be useful for the molecular typing of adenoviruses. In conclusion, advanced studies with large number of specimens are necessary to achieve a reliable, detailed national adenovirus database.

**Key words:** Adenovirus; DNA sequencing; molecular typing.

## GİRİŞ

Günümüzde, *Mastadenovirus* cinsine dahil olan adenovirüsler yedi alt grupta (A-G) incelenir ve bu alt gruplar 55 farklı serotip içerir. Farklı serotipleriyle tüm yaş gruplarında üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE ve ASYE) konjunktivit, keratokonjunktivit, hemorajik sistit ve gastroenterit etkeni olabilir<sup>1,2</sup>. Adenovirüslara bağlı gelişen birçok enfek-

siyon kendini sınırlayan klinik tablolarla seyretmekle birlikte, özellikle yenidoğan, çocuk ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda daha ciddi, hatta bazen ölümcül enfeksiyonlar ortaya çıkabilir. Adenovirus serotiplerinin gösterdiği doku tropizmi nedeniyle, bazı serotiplerle oluşturdukları klinik tablolar arasında ilişki bulunmaktadır. Örneğin; serotip 2-4, 6-8, 19 ve 37 sıklıkla konjunktivit ve keratokonjunktivit olgularından, serotip 1-7 akut solunum yolu enfeksiyonu olgularından, serotip 31, 40, 41, 52 gastroenterit olgularından, serotip 2, 11, 34 ve 35 ise hemorajik sistit olgularından izole edilir<sup>1-4</sup>.

Adenovirusların tiplendirilmesinde genellikle nötralizasyon ve hemaglütinasyon inhibisyon testleri gibi konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak günümüzde bu yöntemlerin yerini DNA dizi analizi teknikleri almıştır<sup>5,6</sup>. Bu çalışmada, farklı klinik tablolar gösteren olgulardan izole edilen adenovirusların hekzon geninin bir bölümünü hedefleyen PCR ve DNA dizi analizi yöntemleriyle tiplendirilmesi ve klinik örneklerde baskın olan tiplerin saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hastalar ve Örnekler

Rutin viroloji laboratuvarına 01 Ocak 2011-31 Mayıs 2011 tarihleri arasında viral üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE ve ASYE) ön tanısıyla gelen 295 nazofarengeal sürüntü örneğine solunum virusları hücre kültürü (n= 232) ve solunum virusları multipleks PCR testi (n= 63) uygulandı. Konjunktivit tanısıyla gelen 42 konjunktival sürüntü, gastroenterit tanısıyla gelen 13 dışkı, sistit tanısıyla gelen iki idrar örneğine ise sadece adenovirus hücre kültürü testi uygulandı. Rutin uygulamada "shell vial" hücre kültürü tekniği kullanıldı. Hep-2, MDCK, A-549 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya) ve Vero (National Public Health Institute, Helsinki, Finlandiya) hücre dizileri sırasıyla, solunum sinsityal virusu (RSV), *influenza virus* (INF-V) tip A ve B, *adenovirus* (AdV) ve *parainfluenza virus* (PIV) tip I-III izolasyonunda kullanıldı. Her virusa özgül floresan izotiyosiyanat ile işaretlenmiş monoklonal antikolarla (Light Diagnostic, Millipore, Amerika) etkenler saptandı. RSV, INF-V tip A ve B, PIV tip I-IV, AdV, *human metapneumovirus* (hMPV), *rhinovirus* (RV), *coronavirus* (CoV) ve *human bocavirus* (hBoV)'u aynı anda saptayan solunum virusları multipleks PCR kiti (RV15 Screening, Seegene, Güney Kore) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Bu çalışmaya rutin uygulama sırasında, nazofarengeal sürüntü (n= 14), konjunktival sürüntü (n= 7) ve dışkı (n= 1) örneklerinde "shell vial" hücre kültürü yöntemiyle AdV pozitif bulunan 22 hastanın klinik örnekleri dahil edildi. Örnekler PCR ve DNA dizi analizi işlemleri yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

### Adenovirus Hekzon PCR ve DNA Dizi Analizi

Viral transport besiyerinde bulunan klinik örneklerden 200 µl alınarak Qiagen MinElute Virus Spin kiti (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı. Lu ve Erdman<sup>5</sup> tarafından tanımlanan, hekzon geninin bir bölümü olan *hipervariable region* 1-6'yı hedefleyen PCR primerleri [Adhex F1- (nt 19135-19160; 5'-TICTTTTGACATTCGIGGIGTICTIGA-3'), Adhex R1- (nt 20009-20030; 5'-

CTGTCTACIGCCTGRTTCCACA-3') kullanılarak amplifikasyon yapıldı [PCR ürün büyüklüğü; (AdhexF1-R1): 895 bp]. Bu amaçla önce 95°C'de 15 dakika denatürasyon daha sonra sırasıyla 94°C'de 1 dakika, 45°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakikalık 40 PCR döngüsü uygulandı. Son olarak 72°C'de 5 dakika bekletildi. İlk reaksiyonda DNA dizi analizi için yetersiz ürün elde edildiğinde Adhex F2 (nt 19165-19187; 5'-GGYCCYAGYTTTAARCCC-TAYTC-3') ve Adhex R2 (nt 19960-19985; 5'-GGTTCTGTCTCCCCAGAGARTCIAGCA-3') primerleri ile "nested" PCR yapıldı ["nested" PCR ürün büyüklüğü; (AdhexF2-R2): 820 bp]. DNA dizi analizi, amplifikasyon primerleri ve Sequence Reagent Mix-DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kiti (Amersham Pharmacia Biotech Inc, ABD) kullanılarak ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında yapıldı. Adenovirüs dizileri, BLAST analiziyle GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sekans veri tabanı kullanılarak tiplendirildi<sup>5,7</sup>.

Ayrıca, adenovirüslerin moleküler tiplendirilmesinde "neighbor-joining" metoduyla filogenetik analiz yapıldı. Referans adenovirüs sekansları (Adv A31; AB601037, Adv B3; FJ943637, Adv C5; FJ943627, Adv D8; AB500121, Adv E4; AY599837, Adv F41; FR849507) GenBank'tan alındı ve filogenetik ağaç CLC Sequence Viewer 6.5.1 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark) programı kullanılarak oluşturuldu.

## BULGULAR

Çalışmamızda, nazofarengeal sürüntü örneği gönderilen hastaların 85 (%28.8)'inde bir veya birden fazla solunum virüsü saptanmış; 10 hastanın iki etken ile enfekte olduğu izlenmiştir. Toplam 95 suşun %31.6'sının INF-V (24'ü tip A, 6'sı tip B), %22.1'inin RSV (n= 21), %15.8'inin PIV (4'ü tip I, 1'i tip II, 10'u tip III), %14.7'sinin Adv (n= 14), %8.4'ünün RV (n= 8), %4.2'sinin CoV (n= 4) ve %3.2'sinin hMPV (n= 3) olduğu belirlenmiştir. Solunum virüsleri, 20 hastanın örneğinde multipleks PCR testi, 65 örnekte ise hücre kültürüyle tanımlanmıştır.

Solunum örneklerinde saptanan adenovirüslerin tümü (n= 14) hücre kültürü yöntemiyle pozitif bulunan örneklerdir. Çalışmaya alınan 42 konjunktival sürüntü örneğinin 7 (%16.7)'sinden ve 13 dışkı örneğinin 1 (%7.7)'inden Adv izole edilmiş, idrar örneklerinde üreme saptanmamıştır. Buna göre çalışmaya dahil edilen örneklerin 22'sinden Adv izolasyonu gerçekleşmiştir. Bu suşlar, sekizi erişkin (dört erkek, dört kadın; medyan yaş: 32.5 yıl) ve 14'ü çocuk (yedi erkek, yedi kadın; medyan yaş: 1 yıl) hastaya ait örneklerden izole edilmiştir (Tablo I). Rutin laboratuvar çalışmalarından kesit olarak alınan beş aylık sürede, ÜSYE ve ASYE olan hastaların nazofarengeal örneklerinde Adv pozitiflik oranı %4.7 olarak bulunmuştur. Bu hasta grubunda, diğer solunum virüslerine göre adenovirüsün etken olarak dördüncü sırada yer aldığı izlenmiştir. Konjunktiva örneklerinde ise adenovirüs pozitifliği %16.7 oranında tespit edilmiştir.

İzolatların tiplendirilmesinde; serotip 3, 4 ve 8 olmak üzere üç farklı tip saptanmıştır. Adenovirüs tip 3, biri gastroenterit, altısı ÜSYE/ASYE olgusu olmak üzere 7 (%31.8) hastadan; adenovirüs tip 8, beşi ÜSYE/ASYE, yedisi konjunktivit olmak üzere 12 (%54.5) hastadan; adenovirüs tip 4 ise, ÜSYE/ASYE olan 3 (%13.7) olgudan izole edilmiştir (Tab-

**Tablo I. Hastaların Yaş, Cinsiyet ve Klinik Tanılarına Göre Adenovirus Serotipleri**

| Hasta No | Cinsiyet-Yaş | Örnek tipi | Klinik tanı   | Adenovirus tipi | GenBank Kayıt No | Maksimum Benzerlik (%) |
|----------|--------------|------------|---------------|-----------------|------------------|------------------------|
| 1        | K - 3        | Dışkı      | Gastroenterit | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 2        | E - 1        | NP         | ASYE          | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 3        | E - 1        | NP         | ASYE          | 3               | FJ943637.1       | 96                     |
| 4        | E - 4        | NP         | ASYE          | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 5        | K - 1        | NP         | ÜSYE          | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 6        | K - 10 ay    | NP         | ASYE          | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 7        | E - 12       | NP         | ASYE          | 3               | FJ943637.1       | 99                     |
| 8        | K - 16       | NP         | ÜSYE          | 4               | AB433753.1       | 95                     |
| 9        | E - 22       | NP         | ASYE          | 4               | AB433753.1       | 95                     |
| 10       | K - 40       | NP         | ASYE          | 4               | AB433753.1       | 94                     |
| 11       | K - 1 hafta  | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 12       | K - 1 hafta  | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 13       | E - 3 hafta  | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 14       | E - 2 hafta  | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 15       | K - 27       | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 16       | E - 34       | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 17       | K - 30       | KS         | Konjunktivit  | 8               | AB500121         | 99                     |
| 18       | K - 32       | NP         | ÜSYE          | 8               | AB500121         | 95                     |
| 19       | E - 33       | NP         | ÜSYE          | 8               | AB500121         | 95                     |
| 20       | E - 37       | NP         | ÜSYE          | 8               | AB500121         | 97                     |
| 21       | K - 10 ay    | NP         | ÜSYE          | 8               | AB500121         | 97                     |
| 22       | E - 2        | NP         | ASYE          | 8               | AB500121         | 97                     |

ASYE: Alt solunum yolu enfeksiyonu; ÜSYE: Üst solunum yolu enfeksiyonu; NP: Nazofarengeal sürüntü; KS: Konjunktival sürüntü.

lo I). Erişkin ve çocuk hastaların klinik tanılarına göre saptanan AdV suşları, GenBank'tan elde edilen referans dizilere göre maksimum benzerlik yüzdeleriyle birlikte Tablo I'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, ÜSYE; akut bronşit, bronşiyolit ve pnömoni ile seyreden, ASYE; konjunktivit ve gastroenterit olmak üzere dört temel klinik tabloya sahip hastalardan alınan örneklerden, hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemiyle izole edilen adenoviruslar DNA dizi analizi yöntemiyle tiplendirilmiş ve bu klinik tablolarda, tip 3, 4 ve 8 olmak üzere üç farklı adenovirus tipinin etken olduğu saptanmıştır. AdV tip 3, genellikle akut solunum yolu olgularından izole edilen bir serotiptir. Özellikle bir arada yaşanan kalabalık ortamlarda ve askeri birliklerde akut solunum yolu enfeksiyonu salgınlarına neden olur. Farenjit, tonsillit, bronşit ve pnömoni en sık izole edildiği klinik tablolardır<sup>6,8</sup>. Bizim çalışmamızda

AdV tip 3, ÜSYE olan bir hastada ve akut bronşiyolit ve pnömoni bulguları ön planda olan beş ASYE olgusunda saptanmıştır. Tip 3'e bağlı gelişen alt solunum yolu enfeksiyonları erişkinlere oranla genellikle çocuk hastalarda görülmektedir<sup>8,9</sup>. Bu çalışmada da AdV tip 3 ile enfekte olan hastaların tümü çocuk hastalardır. Ayrıca bu grupta, tip 3'ün etken olduğu bir gastroenterit olgusu bulunmaktadır (Tablo I). Yapılan araştırmalarda, gastroenterit olgularından en sık serotip 40, 41'in izole edildiği, serotip 3'ün ise nadiren bu olgularda saptandığı bildirilmiştir<sup>6,8,10</sup>.

Adenovirus tip 4, faringokonjunktival ateş, bronşit ve pnömoni gibi ASYE ve akut solunum sıkıntısı gibi ciddi solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilmektedir. Genellikle beş yaş altı çocuk hastalarda akut solunum yolu hastalıklarına neden olur<sup>6,8</sup>. Bu çalışmada, biri ÜSYE, ikisi ASYE kliniği olan üç hastada AdV tip 4 saptanmıştır. Hastaların ikisi erişkin, biri 16 yaşında çocuk hastadır. ASYE olan hastaların ikisi de pnömoni kliniğiyle izlenmiştir.

Adenovirus tip 8, epidemik keratokonjunktivit ve faringokonjunktivit olgularında en sık rastlanılan tiptir<sup>6</sup>. Tip 8'in etken olduğu konjunktivit olguları tüm yaş gruplarında görülse de daha çok çocuk hastalar etkilenmektedir<sup>2,6</sup>. Çalışmamızda, AdV tip 8 çoğunluğu konjunktivit olgusu olmak üzere toplam 12 hastada saptanmıştır. Konjunktivit (n= 7) ve ÜSYE (n= 4) kliniği olan hastaların tümü yenidoğan ve yenidoğan kliniğinde görevli sağlık çalışanlarından oluşmaktadır. AdV tip 8, ASYE olgularından nadiren etken olarak izole edilmektedir<sup>6</sup>. Bu çalışmada da iki yaşında bir çocuk hastada ASYE nedeni olarak AdV tip 8 saptanmıştır.

Adenovirus enfeksiyonlarının cinsiyet dağılımı incelendiğinde, erkeklerde daha sık görüldüğü ifade edilmektedir<sup>9,11</sup>. Bu çalışmada erkek/kadın oranı 1 olup, bu durumun çalışma kapsamına alınan olgu sayısının kısıtlı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Adenovirüslerin tiplendirilmesinde kullanılan klasik yöntemler olan serum nötralizasyon ve hemagglütinasyon inhibisyon testleri, hiperimmün poliklonal reaktiflerin kullanılmasını gerektiren, zaman alıcı ve zahmetli testlerdir. Ayrıca bazı AdV serotipleri arasında çapraz reaksiyon olabildiği için test sonuçlarının değerlendirilmesi zordur<sup>5,12</sup>. Son zamanlarda, adenovirüslerin ortak bölgesi olan hekson genini hedefleyen PCR ve DNA dizi analizi yöntemleri konvansiyonel yöntemlerin yerine adenovirüslerin tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu yöntemin daha pratik olduğu ve elde edilen sonuçların, konvansiyonel yöntemlerle uyumlu olduğu bildirilmiştir<sup>1,2</sup>. Bu çalışmada adenovirüslerin tiplendirilmesinde, Lu ve Erdman'ın<sup>5</sup> geliştirdiği, adenovirüslerin hekson geni "hipervariable region" 1-6'yı hedefleyen PCR ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Yöntem, direkt olarak klinik örneğe uygulanmış, diziler hızla elde edilmiş ve BLAST analiziyle tiplendirilmiştir<sup>7</sup>. Adenovirus dizileri BLASTN programında referans dizilerle karşılaştırılmış ve %94 ile %99 oranında uyumlu bulunmuştur (Tablo I). Ülkemizde, klinik örneklerden izole edilen adenovirüslerin tiplendirilmesiyle ilgili makaleler oldukça sınırlı sayıdadır. Çalışmalarda daha çok konjunktiva örneklerinin değerlendirildiği ve en sık adenovirus tip 8'in saptandığı görülmüştür<sup>13,14</sup>.

Sonuç olarak, konjunktivit ve ÜSYE olgularında en fazla AdV tip 8, ASYE olgularında ise en fazla AdV tip 3 saptanmıştır. Adenovirus tip 4, literatür bilgilerinin aksine bu çalışmada daha çok (2/3) erişkin hastalarda saptanmıştır. Adenovirus tip 8 ile enfekte olguların çoğunluğunun çocuk hastalar ve çocuk kliniğinde görevli sağlık personeli olduğu görülmüştür. Adenovirus serotiplerini belirlemede, hekzon geni dizilerinin BLASTN programında tiplendirilmesi seçilecek en uygun yöntemlerden birisidir. Ülkemizde, daha fazla örnek sayısı ile adenovirus enfeksiyonlarında tiplerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılması, ulusal epidemiyolojik verinin birikmesi açısından son derece önemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Ishiko H. Molecular diagnosis of human adenoviruses d and e by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1577-84.
2. Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 3963-9.
3. Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA (eds). Adenovirus infections, pp: 211-2. In: Redbook: 2006 Infection Diseases Board Report. 2006, 27<sup>th</sup> ed. American Academy of Paediatrics, IL.
4. Rojas LJ, Jaramillo CA, Mojica MF, Escalante MP, Delgado P. Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian paediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiol Infect* 2012; 140(5): 818-22.
5. 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(8): 1587-602.
6. Swenson PD, Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenoviruses, pp: 1404-17. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8<sup>th</sup> ed. American Society of Microbiology, Washington, DC.
7. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17): 3389-402.
8. Xie L, Yu XF, Sun Z, et al. Two adenovirus serotype 3 outbreaks associated with febrile respiratory disease and pharyngoconjunctival fever in children under 15 years of age in Hangzhou, China during 2011. *J Clin Microbiol* 2012; 50(6): 1879-88.
9. Mandelboim M, Dror P, Azar R, Bromberg M, Mendelson E. Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: epidemiology and molecular characterization. *J Clin Microbiol* 2011; 49(2): 597-601.
10. Gomes SA, Candeias JA, Monteiro SP, Pereira HG, Niel C. New genome types of adenovirus types 1, 3, and 5 isolated from stools of children in Brazil. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 1022-6.
11. Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 2007; 45(9): 1120-31.
12. Wigand R. Pitfalls in the identification of adenoviruses. *J Virol Methods* 1987; 16(3): 161-9.
13. Yağci R, Akçalı A, Yagci S, et al. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol* 2009; 20(4): 669-74.
14. Ersoy Y, Otlu B, Türkçüoğlu 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(2): 144-9.