

Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Adenovirusların Araştırılması

Investigation of Adenoviruses in Children with Lower Respiratory Tract Infections

İmran SAĞLIK¹, Derya MUTLU¹, Gözde ÖNGÜT¹, Sevtap VELİPAŞAOĞLU GÜNEY², Aykut ÖZKUL³, Dilara ÖÇÜNÇİ¹, Dilek ÇOLAK¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

¹ Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya.

² Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Antalya, Turkey.

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara University Faculty of Veterinary, Department of Virology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 25.01.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.02.2013

ÖZET

Adenoviruslar tüm dünyada epidemik, endemik veya sporadik olarak yıl boyunca ve her yaşta görülebilen akut solunum yolu enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Adenovirus enfeksiyonları alt solunum yollarına ilerleyerek, bronşit, bronşiyolit ve pnömoni tablolarına da sebep olmaktadır. Bu çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) olan çocuklarda etken olarak adenovirusların hücre kültürü, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve direkt floresan antikor testi (DFA) yöntemleriyle araştırılması ve sonuçların hastaların klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında hastanemize başvuran ve ASYE tanısı konulan 0-5 yaş arasındaki 206 hasta alınmıştır. Hastaların klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları kaydedilmiştir. Tüm hastalardan nazofarengeal sürüntü örnekleri *flocked* eküvyon ile alınarak, *shell-vial* hücre kültürü, gerçek zamanlı PCR ve DFA testi ile adenovirus varlığı araştırılmıştır. Örneklerin %89.3'ü Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınmış olup, %38'inde eşlik eden kromozomal anomali, konjenital kalp hastalığı, kalp yetmezliği, astım, kistik fibrozis, lösemi, böbrek yetmezliği ve prematürite gibi bir veya birden fazla kronik hastalık bulunmaktadır. Örneklerin 12 (%5.8)'sinde PCR ile, 7 (%3.4)'sinde hücre kültürü ile adenovirus pozitifliği saptanmıştır. Yedi (%3.4) örnek hem hücre kültürü hem de PCR ile pozitifken, 194 (%94.2) örnek her iki testle de negatif bulunmuştur. PCR ile pozitif bulunan beş örnek hücre kültüründe ürememiştir. DFA testi ile incelenen 153 örnekten 12'si hücre miktarı yetersiz olduğundan değerlendirilememiş, geri kalan örneklerin %2.8 (4/141)'inde adenovirus antijenleri saptanmıştır. Bu örnekler diğer iki testle de pozitif bulunan örneklerdir. Hücre

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Dilek Çolak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070 Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 249 6911, **E-posta (E-mail):** dcolak@akdeniz.edu.tr

kültürüyle karşılaştırıldığında PCR testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değeri sırasıyla %100, %97.5, %58.3, %100; DFA testinin ise sırasıyla %57, %100, %100, %97.7 olarak belirlenmiştir. PCR testi ile karşılaştırıldığında hücre kültürünün duyarlılığı, üç günlük inkübasyon sonrasında çok düşükken (%16.6), beş günlük inkübasyon sonrasında %58.3'e yükselmiştir. Adenovirus pozitifliği, kronik hastalık varlığı, radyolojik bulgular ve laboratuvar bulgularıyla ilişkili bulunmamıştır. Adenovirus pozitif örneklerin %83.3'ünün Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınan örnekler olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, ASYE olan çocukların yaklaşık %6'sında adenovirusların etken olduğu saptanmıştır. Solunum yollarında adenovirus izolasyonunda en önemli basamak kaliteli ve yeterli miktarda örnek alınmasıdır. Esnek *flocked* eküvyonlar çocuklarda nazofarengeal sürüntü örneği alınmasını kolaylaştırmaktadır. Adenovirus enfeksiyonlarının tanısında altın standart hücre kültürü olmakla birlikte, tanıda yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip aynı gün sonuç veren PCR yöntemi kullanılabilir, ancak ekstraksiyon aşamasında yeterli örnek alınıp alınmadığı kontrol edilmelidir. DFA'nın düşük duyarlılığı, kullanımını kısıtlamakla birlikte örnek kalitesinin bu yöntemle anlaşılabilirliği akılda tutulmalıdır.

Anahtar sözcükler: Adenovirus; alt solunum yolu enfeksiyonu; çocuk; hücre kültürü; polimeraz zincir reaksiyonu; direkt floresan antikor.

ABSTRACT

Adenoviruses which are one of the causative agents of acute respiratory tract infections at all age groups worldwide, can lead to epidemic, endemic or sporadic infections year-round. Adenovirus infections in lower respiratory tract can be presented as bronchitis, bronchiolitis and pneumonia. The aim of this study was to investigate the presence of adenoviruses as the etiologic agent of lower respiratory tract infections (LRTIs) in children by cell culture, polymerase chain reaction (PCR) and direct fluorescence antibody (DFA) test. The results of the laboratory tests were evaluated in the light of patients' clinical findings. The study consisted of 206 patients aged between 0-5 years old and who were admitted to the hospital with the complaints of LRTI between January 2011 and April 2012. The clinical, radiological and laboratory findings of the patients were recorded. Nasopharyngeal specimens were taken with flocked swab from all patients and adenoviruses were investigated by shell-vial cell culture, real-time PCR and DFA test, simultaneously. Of all the samples 89.3% were taken in January, February and March and 38% of the patients have one or more chronic underlying diseases as chromosomal abnormalities, congenital heart disease, heart failure, asthma, cystic fibrosis, leukemia, kidney failure and prematurity. Adenovirus was detected in 12 (5.8%) of the samples by PCR, seven (3.4%) of the samples by cell culture method. While seven samples were found positive with both PCR and cell culture, 194 samples yielded negative results in both tests. Five samples, which were found positive by PCR, were not grown in cell culture method. Twelve of the 153 samples examined with DFA test, could not be evaluated due to insufficient amount of cells, however 2.8% (4/141) of the samples were found positive for adenovirus antigens by DFA method. Those samples were also positive ones in the other two methods. Compared with cell culture, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of PCR were 100%, 97.5%, 58.3% and 100%, respectively; those values were 57%, 100%, 100% and 97.7%, respectively for DFA testing. Compared to PCR the sensitivity of cell culture is very low (16.6%) after three days of incubation, however, it increased to 58.3% after five days' of incubation. There was no significant relationship between adenovirus positivity and the presence of chronic diseases, the radiological findings and the laboratory findings. Of all adenovirus positive samples 83.3% were obtained in January, February and March. Our data indicated that the etiologic agent was adenovirus in approximately 6% of children with LRTI. The most important step for the isolation of adenovirus from respiratory tract, is high quality and sufficient amounts of sample. The flexible flocked swabs made it easy to take nasopharyngeal swab from children. Although cell culture is still the gold standard for the diagnosis of adenovirus infections, PCR which is a fast method with high sensitivity and specificity can also be used. However, specific care should be taken during the DNA extraction stage, since the amount of the nucleic acid in the sample is critical for the best results. Even though the low sensitivity of DFA restricts its use in routine diagno-

sis of adenovirus infections, it should always be kept in mind that the quality of the clinical samples is most reliably evaluated by this method.

Key words: Adenovirus; lower respiratory tract infections; children; cell culture; polymerase chain reaction; direct fluorescent antibody.

GİRİŞ

Adenovirus enfeksiyonları tüm dünyada epidemik, endemik veya sporadik olarak tüm yıl boyunca ve her yaşta görülmektedir. Tüm akut solunum yolu enfeksiyonlarının %2-3'ü adenoviruslara bağlıdır¹. Adenoviruslarla ilişkili üst solunum yolu enfeksiyonları sıklıkla soğuk algınlığı, farenjit ve tonsillit şeklinde görülmekte ve olguların yaklaşık %50'sinde virus, adenoid ve tonsiller dokuda latent olarak kalmaktadır. Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonları, adenovirus enfeksiyonuna bağlı sık görülen komplikasyonlardır. Virusun özellikle okul, yurt, askeri birlik, yenidoğan üniteleri gibi toplu yaşam koşullarında salgınlara neden olabileceği bilinmektedir¹⁻³. Özellikle 6 ay-5 yaş arası çocuklarda enfeksiyon görülme sıklığı daha fazladır; 6-12 ay arası çocukların %33'ü en az bir kez virusla karşılaşmıştır; 5 yaşındaki çocukların ise %75'i seropozitifdir^{1,4}. Çocukluk çağı pnömonilerinin %10'undan adenoviruslar sorumlu tutulmaktadır^{4,5}.

Adenovirus enfeksiyonlarının klinik olarak bakteriyel ve diğer viral enfeksiyonlardan ayırımı zor olduğundan tanı için laboratuvar testlerine ihtiyaç vardır. Özellikle salgınlarda etkenin erken tanımlanması önemlidir¹. Enfeksiyonların tanısı, virus izolasyonu ve viral antijen ya da viral genomun saptanması gibi direkt yöntemlerle yapılmaktadır. Sero-lojik testlerle adenovirus antikorlarının saptanması, duyarlılığının düşük olması ve özellikle immünitesi tam olmayan konakta yetersiz antikor yanıtı nedeniyle tercih edilmez. Tanıda altın standart olmasına karşın, hücre kültürünün zaman alıcı ve zahmetli olması, buna karşın viral DNA'nın moleküler yöntemlerle hızlı ve duyarlı şekilde saptanabilmesi, son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli testlerin tanı laboratuvarlarında yaygın kullanılmasına neden olmuştur⁵⁻⁷. Diğer yandan birçok klinik tanı laboratuvarında klasik hücre kültürünün yerini daha kısa sürede sonuç veren *shell-vial* yöntemi almıştır. Adenovirus izolasyonunda konvansiyonel hücre kültürüyle karşılaştırıldığında, *shell-vial* yöntemiyle iki günde %50-85 duyarlılık oranlarında saptama yapılabilirken, inkübasyonun beş güne uzatılmasının duyarlılığı artırdığı belirtilmektedir².

Bu çalışmanın amacı alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) tanısı alan çocuklarda etken olarak adenovirusların hücre kültürü, PCR ve direkt floresan antikor (DFA) yöntemleriyle araştırılması ve sonuçların hastaların klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışmaya, Ocak 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğinde bronşit, bronşiyolit, pnömoni şeklinde ASYE tanısı alan 0-

5 yaş arasındaki 206 hasta alındı. ASYE varlığı öksürük, hırıltılı solunum, ateş yakınmaları ve muayenede solunum sıkıntısı, takipne, oskültasyonla patolojik solunum sesi varlığı, direkt akciğer grafisinde patolojik görünüm ve laboratuvar bulgularıyla belirlendi.

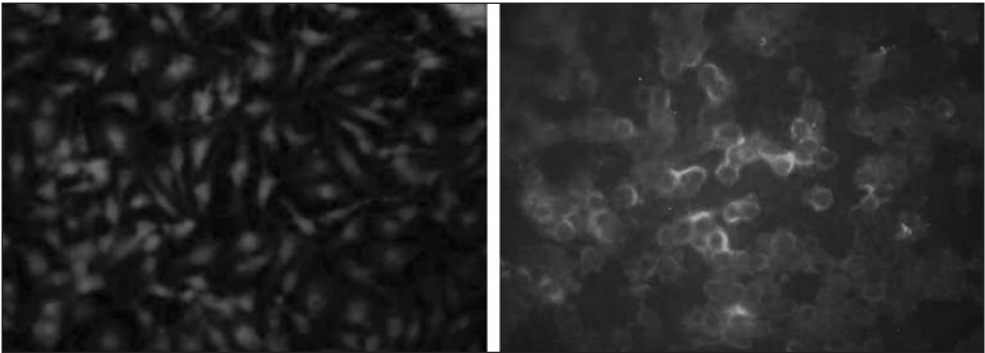
Hasta yakınlarının onamı alındıktan sonra, hastaların nazofaringeal sürüntü örnekleri *flocked* eküvyon (Copan Diagnostics, İtalya) ile alınarak, viral taşıma besiyeri (Copan Diagnostics, İtalya) içeren tüp içinde laboratuvara ulaştırıldı. Tüpler 30 saniye vortekslenerek eküvyonun üzerindeki örnek materyalinin besiyerine geçmesi sağlandı. Örnekler, *shell-vial* (SV) hücre kültürü, PCR ve DFA testleri için ayrıldı.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü için A549 (insan akciğer karsinoma) hücreleriyle %10 fetal dana serumu (Sigma, Almanya), %2 L-glutamin (Sigma, Almanya), %1 HEPES (Sigma, Almanya), %1 penisilin-streptomisin (Sigma, Almanya), %0.1 gentamisin (Sigma, Almanya) ve %0.4 amfoterisin B (Sigma, Almanya) solüsyonu içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Almanya) besiyeri kullanıldı. Hasta örnekleri 1000xg'de beş dakika santrifüj edildikten sonra her örnekten üçer adet olmak üzere 300 µl örnek SV tüplerine inoküle edildi. Tüpler 700xg'de oda ısısında bir saat santrifüj edildi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda bir saat virusun hücreye adsorbe olabilmesi için bekletildi, ardından her tüpe besiyeri eklendi. SV tüpleri 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda ve farklı sürelerde (her örnekten biri üç, biri dört ve biri beş gün olmak üzere) inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler asetonla fikse edilerek lameller Adenovirus DFA Kit (Light Diagnostics, Millipore, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı. Floresan mikroskopta (Olympus BX50, Japonya) 20x ve 40x büyütmede değerlendirildi. En az iki veya daha fazla sayıda hücrenin tipik floresans verdiği örnekler pozitif olarak kabul edildi (Resim 1). Hasta örnekleriyle birlikte kit içerisinde bulunan pozitif ve negatif kontroller de boyanarak değerlendirildi.

Gerçek Zamanlı PCR

Hasta örneklerinden DNA ekstraksiyonu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. Gerçek zamanlı PCR ise LightMix Kit Human Adenovirus (TIB MOLBIOL, Alman-



Resim 1. Solda: Ekim yapılmamış A549 hücreleri (40x). Sağda: A549 hücrelerinde adenovirus varlığının FITC ile işaretli monoklonal antikoriyle gösterilmesi (40x).

ya) kiti ile Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics) cihazında gerçekleştirildi. Bu kitle, adenovirus hekson geninin 129 baz çifti (bp) uzunluğundaki bir bölgeyi hedef alan primerler kullanılmakta ve heterojen internal kontrol bulunmaktadır. Kitin alt saptama limiti 100, kantitasyon aralığı ise 100-1.000.000 kopya/ml'dir. Amplifikasyon görülen örneklerde özgüllüğün kontrolü, ürünlerin erime eğrisi analiziyle yapıldı.

DFA Testi

Adenovirus DFA kiti (Light Diagnostics, Millipore, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Kısaca; 4°C ısıda santrifüjde (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Almanya) 400xg hızla 10 dakika santrifüj edilen örneklerin dibe çöken kısmından 80 µl alınarak 800 rpm hızda 3 dakika sitosantrifüj (Thermo Electron Corporation Cytospin 4, ABD) uygulandı ve yayma hazırlandı. Yaymalar havada kuruduktan sonra hücreler asetonla fikse edildi. Tekrar havada kurutulan yaymalar kullanılan kit ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı. Hücre miktarının yeterli sayıda olduğu yaymalar floresan mikroskopta 20x ve 40x büyütmede tarandı. En az iki veya daha fazla sayıda intakt hücrenin adenovirus için tipik floresan verdiği yaymalar pozitif olarak değerlendirildi. Enfeksiyon göstergesi olarak hücrelerde düzgün parlak nükleer ve/veya noktalı sitoplazmik floresan varlığı araştırıldı (Resim 2). Yaymalar değerlendirilirken, kit içeriğinde yer alan pozitif ve negatif kontroller de incelendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel veri analizi için SPSS 18.0 programı kullanıldı. Veriler arasında karşılaştırma yaparken Mann-Whitney U, Pearson Chi-Square ve Fisher's Exact testlerinden yararlanıldı. p değeri < 0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 206 hastanın 12 (%5.8)'sinde en az bir yöntemle adenovirus saptanmıştır. Hastalara ait demografik bilgiler, örneğin alındığı birim, klinik tanı ve muayene bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir.



Resim 2. Nazofaringeal sürüntü örneğinde DFA ile adenovirus antijen pozitifliği (40x).

Tablo I. Hastaların Demografik Bilgileri, Klinik Tanı ve Bulguları ile Örneklerin Alındığı Birimler

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

ÇSHA: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı.

Örneklerin %89.3'ü Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınmıştır. Hastaların %38'inde eşlik eden kronik bir hastalık [kromozomal anomali (down sendromu, pompe hastalığı), konjenital kalp hastalığı (ASD, VSD), kalp yetmezliği, astım, kistik fibrozis, lösemi, böbrek yetmezliği ve prematürite] mevcuttur. Adenovirus saptanan çocuklarda kronik hastalık varlığı [kromozomal anomali + konjenital kalp hastalığı (n= 1), konjenital kalp hastalığı (n= 2), metabolik hastalık + koanal atrezi (n= 1), çölyak hastalığı (n= 1), atopik dermatit (n= 1)], adenovirus negatif çocuklardan daha fazla olmasına rağmen aradaki fark

anlamli bulunmamıştır (sırasıyla %50 ve %37.6; $p= 0.5$). Örnek alındığı sırada hastaların %37.9'u antibiyotik tedavisi almaktadır.

Adenovirus saptanan 12 hastadan 10'unun klinik şikayetleri 1-3 gün önce başlamış olup, 4'ü örnek alındığında antibiyotik kullanmaktadır. Adenovirus pozitif örneklerin %83.3'ü Ocak, Şubat ve Mart aylarında alınan örneklerdir.

Çalışılan 206 örneğin 7 (%3.4)'sinde hem hücre kültürü hem de PCR ile adenovirus saptanırken, 194 (%94.2) örnek her iki testle de negatif bulunmuştur (Resim 1). Örneklerin 12 (%5.8)'sinde PCR ile, 7 (%3.4)'sinde hücre kültürü ile adenovirus saptanmıştır. Toplam 12 adenovirus pozitif örneğin %100'ü PCR ile, %58.3'ü hücre kültürü ile tanımlanmıştır. PCR ile pozitif bulunan beş örnekte hücre kültüründe adenovirus üremesi olmamıştır (Tablo II). DFA testi ile 153 örnek incelenebilmiş; bunların 12'si hücre miktarı yetersiz olduğundan değerlendirilememiş; kalan 141 örneğin 4 (%2.8)'ü her üç yöntemle de pozitif bulunmuştur (Tablo II) (Resim 2).

Hücre kültürüyle karşılaştırıldığında PCR ve DFA testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla Tablo III ve Tablo IV'te verilmiştir. PCR testi ile karşılaştırıldığında hücre kültürünün duyarlılığı üç günlük inkübasyon sonrasında çok düşüken (%16.6), beş günlük inkübasyon sonrasında %58.3'e yükselmiştir (Tablo V).

Hastaların radyolojik özellikleri, laboratuvar bulguları ve tedavi uygulamaları Tablo VI'da gösterilmiştir. Adenovirus pozitif ve negatif hastaların radyolojik özellikleri ve laboratuvar bulguları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Aynı şekilde her iki gruba uy-

Tablo II. Adenovirus Pozitif Örneklerde Test Sonuçları ile Hastalara Ait Bilgiler

Örneğin alındığı tarih	Cinsiyet	Yaş (ay)	PCR (kopya/ml)	DFA	Hücre kültürü (ürediği gün)	Tanı	Eşlik eden hastalık
26.10.2011	E	18	< 100	-	-	B-B	Çölyak hastalığı
20.12.2011	E	2	15.200	ND	-	B-B	Yok
09.02.2012	K	18	< 100	-	-	PN	Down sendromu, KKH
05.03.2012	K	9	< 100	+	+	B-B	Koanal atrezi, metabolik hastalık
07.03.2012	K	18	787	-	-	B-B	Yok
10.03.2012	E	16	< 100	-	+	B-B	Yok
13.03.2012	E	9	< 100	-	-	B-B	Yok
14.03.2012	K	18	> 1.000.000	+	+	B-B	Atopik dermatit
14.03.2012	E	1	< 100	-	+	B-B	ASD
16.03.2012	E	18	< 100	-	+	B-B	Yok
20.03.2012	E	48	8880	+	+	B-B	Kalp yetmezliği
25.03.2012	E	48	< 100	+	+	B-B	Yok

E: Erkek; K: Kadın; ND: Yapılmadı; B-B: Bronşit-bronşiyolit; KKH: Konjenital kalp hastalığı; PN: Pnömoni; ASD: Atriyal septal defekt; (-): Tipik floresan veren pozitif hücre görülmedi; (+): Tipik floresan veren en az 2-3 hücre görüldü.

Tablo III. PCR Testinin Hücre Kültürüyle Karşılaştırılması

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

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

Tablo IV. DFA Testinin Hücre Kültürüyle Karşılaştırılması

		Kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam
DFA	Pozitif	4	0	0
	Negatif	3	134	137
	Toplam	7	134	141

Duyarlılık: %57, Özgüllük: %100, PPD: %100, NPD: %97.7

Tablo V. Hücre Kültürünün PCR ile Karşılaştırılması

	PCR		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Kültür	Pozitif	7	7
	Negatif	5	199
	Toplam	12	206

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

günlük tedavi protokolleri de benzerdir (Tablo VI). Hastalar, tedaviye yanıtları ve prognozları açısından değerlendirilmemiştir.

TARTIŞMA

ASYE çocukluk çağında oldukça sık görülmekte olup, etken olarak ilk sırada viruslar karşımıza çıkmaktadır. Adenovirusların neden olduğu ASYE erken yaşlarda daha sık görülür ve genellikle iyi seyirlidir. Ancak özellikle iki yaşın altında geçirilen ve/veya tekrarlayan akciğer parankim enfeksiyonları, doku hasarına zemin hazırlayarak, enfeksiyon sonrası bronşiyolitisi obliterans gibi ciddi obstrüktif akciğer hastalıklarına yol açabilir⁸. Bu çalışmada, ASYE olan çocuklarda adenovirusların prevalansı PCR yöntemiyle %5.8 olarak bulunmuş; örneklerin 7 (%3.4)'sinden virus izolasyonu yapılmıştır. PCR ile adenovirus pozitifliği saptanan 12 örneğin sekizinde viral yük oldukça düşük (< 100 kopya/ml) olup, bu örneklerden dördünde hücre kültüründe geç üreme (4. ve 5. günlerde) görülmüştür. Aslan ve arkadaşları⁹ 1997-1998 yıllarında üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda adenovirus pozitifliğini *shell-vial* (SV) yöntemiyle sırasıyla %6 ve %10 olarak bildirmişlerdir. Bodur ve arkadaşları³ 2007 yılında solunum yolu enfeksiyonu şikayetleri

Tablo VI. Hastaların Radyoloji, Laboratuvar Bulguları ve Tedavi Uygulamaları

(n= testin uygulandığı hasta sayısı)	Adenovirus			p
	Toplam (%)	Negatif (%) (n= 194)	Pozitif (%) (n= 12)	
Akciğer grafisi (n= 122)		115	7	
Patolojik görünüm var	65 (53.2)	64 (55.6)	1 (14.3)	0.05
Doğal	57 (46.7)	51 (44.3)	6 (85.7)	
CRP düzeyi (n= 116)		109	7	
Ortanca (aralık) (mg/dl)		0.78 (0.01-26)	1.4 (0.02-11.2)	2.1
Yüksek	75 (64.7)	69 (63.3)	6 (85.7)	0.4
Lökosit sayısı (n= 121)		113	8	
Ortanca (aralık) (1000/mm ³)		11.0 (14.5-38.4)	11.79 (6.8-14.7)	0.9
Yüksek	64 (52.9)	59 (52.2)	5 (62.5)	
Düşük	5 (4.4)	5 (4.1)	0	
Nötrofil sayısı (n= 121)		113	8	
Ortanca (aralık) (1000/mm ³)		4.13 (7.8-29)	5.31 (0.94-8.65)	0.7
Yüksek	27 (22.3)	23 (20.3)	3 (37.5)	
Düşük	15 (12.4)	13 (11.5)	2 (25)	
Lenfosit sayısı (n= 121)		113	8	
Ortanca (aralık) (1000/mm ³)		4.02 (0.35-1.8)	4.23 (1.09-8.4)	0.7
Yüksek	73 (60.3)	68 (60.2)	5 (62.5)	
Düşük	9 (7.4)	8 (7.1)	1 (12.5)	
Trombosit sayısı (n= 121)		113	8	
Ortanca (aralık) (1000/mm ³)		346.0 (25-891)	356.5 (285-582)	0.3
Yüksek	37 (30.6)	34 (30)	3 (37)	
Düşük	9 (7.4)	9 (8)	0	
Tedavi (n= 206)				
Antibiyotik	112 (54.4)	107 (55.2)	5 (41.5)	0.3
Bronkodilatör	80 (38.8)	75 (38.7)	5 (41.7)	0.1
İnhale beta-2 adrenerjik agonist	166 (80.6)	156 (80.4)	10 (83.3)	1
İnhale steroid	79 (38.3)	73 (37.6)	6 (50)	0.5

CRP: C-reaktif protein.

olan ilköğretim çağı öğrencilerinin boğaz sürüntü örneklerinden %2.2 oranında, Beka ve arkadaşları¹⁰ akut solunum yolu şikayetleri olan çocukların boğaz sürüntülerinden %3.6 oranında adenovirus izole etmişlerdir. Bizim saptadığımız oran ülkemizden bildirilen bu değerlerle benzerdir. ASYE olan çocuklarda adenovirus sıklığı Arjantin'de¹¹ %2.7; Brezilya'da¹² %12; Çin'de¹³ %26.5 olarak bildirilmiştir. Adenovirus enfeksiyonlarının yıl boyu görüldüğü bildirilse de, bizim çalışmamızda olduğu gibi olguların kış aylarında artması izolasyon oranını etkileyebilir.

Çocuklarda ASYE daha çok bronşit-bronşiyolit şeklinde karşımıza çıkmakta ve bu iki klinik tanı birbirinden zor ayrıldığı gibi birbirini takip de edebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda hastalar gruplandırılırken bu iki klinik tanı birlikte değerlendirilmiştir. Çalışmamızda adenovirus pozitifliği saptanan hastaların %51.9'u 1 yaş ve altında, %74.8'i ise 2 yaş ve altında olmakla birlikte, adenovirus negatif olan hastalarda da yaş ortalaması düşüktür (Tablo I). Bronşit-bronşiyolit tanısı alan 156 (%75.7) hastada adenovirus pozitifliği %7.1 oranında (11/156) saptanmıştır. Ricart ve arkadaşları¹⁴ bronşitli çocuklarda PCR yöntemiyle bu oranı benzer şekilde (%7.8) bulmuşlardır.

Viral kültür, solunum yolu viruslarının tanısında altın standarttır. Ancak yöntemin başarısı için uygun hasta ve örnek seçimi, örnek miktarının yeterli olması, örneğin uygun koşullarda alınarak laboratuvara taşınması ve çalışılması çok önemlidir⁵. ASYE'de viral etkenlerin tanımlanmasında nazofarengeal aspirat, orofarenks ve/veya nazofarenks sürüntüsü, nazofarenks yıkama solüsyonu, trakeal aspirat, balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL) ve biyopsi gibi örnekler kullanılabilir^{14,15}. Ancak BAL ve akciğer biyopsisi gibi invazif işlem gerektiren yöntemler rutin kullanımda pek tercih edilmemektedir. Yapılan çalışmalarda, nazofarenks yıkama solüsyonunun sürüntü örneklerine göre daha iyi virus izolasyonu sağladığı görülmüş; ancak bu işlemin her hastaya uygulanmasının zor olduğu belirtilmiştir¹⁵. Hücre kültürü için nazofarengeal sürüntü örneklerinin alınmasında viruslar için toksik madde içermeyen ve hasta toleransını kolaylaştıran esnek saplı eküvyonların kullanılması önerilmektedir. Bu çalışmada da kullanılan esnek *flocked* eküvyonların, örneğin alınması sırasında çocuklarda hasta uyumunu kolaylaştırdığı görülmüştür. Ancak çalışmanın başlangıcında alınan ve DFA ile değerlendirilemeyen 12 örnekte hücre miktarının yetersiz olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, birçok mikrobiyolojik çalışmada ilk basamak olan örnek alma işleminin de tecrübeli ve hastayı doğru yönlendirebilen kişiler tarafından yapılması önemlidir. Virus izolasyonunda örnek alımında *flocked* eküvyon kullanımının adenovirus izolasyon oranını azalttığı¹⁶ bildirilmekle beraber, saptama oranını anlamlı olarak etkilemediğine^{17,18} işaret eden yayınlar da vardır. Örnek alımında farklı yöntemler denenmediği için *flocked* eküvyonun saptama oranına etkisi hakkında bir yorum yapılamamıştır.

Adenovirus enfeksiyonlarının tanısında SV yöntemiyle virus izolasyonu klasik hücre kültüründeki gibi sitopatik etkinin oluşması beklenmediği için daha erken tanı sağlamakta, üstelik floresan-işaretleli monoklonal antikorların kullanılması virusun tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak klasik hücre kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılığının daha düşük (%90'a karşı %83) olduğu belirtilmektedir¹⁹. Bununla birlikte inkübasyon süresi iki günden beş güne uzatıldığında duyarlılığın %77'den %100'e ulaştığını bildiren çalışmalar da vardır²⁰. Çalışmamızda SV hücre kültürü yönteminin, PCR ile karşılaştırıldığında 3, 4 ve 5 günlük inkübasyonlar sonrası duyarlılığının giderek arttığı (sırasıyla; %16.6, %33.3 ve %58.3) izlenmiştir. Bu durum örnekteki virus miktarıyla da ilişkili olabilir. En yüksek viral yüke sahip örnek (> 1.000.000 kopya/ml) üçüncü günde üremiş ve DFA'sı da pozitif olarak değerlendirilmiştir. İkinci yüksek viral yüke sahip olan örnek (15.200 kopya/ml) kültürde ürememiş, bu durumun örneğin saklanması sırasında virusun canlılığını kaybetmesi nedeniyle olduğu düşünülmüştür (bu örneğe DFA testi uygulanmamıştır). Enomoto ve arkadaşları²¹ çalışmalarında, 100 kopya/ml adenovirus DNA içeren örneklerde 21 günlük in-

kübasyon sonrası hücre kültürü pozitifliğini %60 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda beş günlük inkübasyon sonrası %62.5 gibi benzer bir oran bulunmuştur. Ayrıca PCR için başlangıç hacmi 400 µl iken, hücre kültürüne 300 µl hacimle ekim yapılmış, bu da %25 oranında bir kayba yol açmıştır. Bir başka çalışmada, PCR yöntemi klasik hücre kültürüyle kıyaslanmış, duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulunmuştur⁷. Solunum yolu viruslarının tanısında kültür altın standart olarak kabul edilse de, PCR testlerindeki gelişmeler nedeniyle bu testler tanıda daha fazla tercih edilir olmuştur. Özellikle örneklerin saklanması ve çalışılmasının daha kolay olması, çok miktarda örneğin çalışılmasına olanak sağlamaları ve duyarlılıklarının diğer yöntemlere göre daha yüksek olması bu testleri avantajlı hale getirmektedir. Ancak solunum yollarından adenovirus saptanması gibi, örneklerde virus içeren hücrelerin bulunmasının gerekli olduğu durumlarda PCR ile alınan negatif sonuçlarda örnek kalitesinin doğrulanması gereklidir. Ticari PCR kitlerinde internal kontrol bulunması, hücre içindeki bir geni saptamaya yönelik olmadıkça, bu tip örnekler için yeterli olmamaktadır. Çalışmamızda PCR pozitif bulunan beş örnek SV hücre kültüründe üretilmemiştir. Bunlardan uygun koşullarda transfer edilmediği saptanan bir örnek dışında diğerlerinin kopya sayısı düşüktür. Kopya sayısı düşük diğer örneklerde inkübasyon uzatıldığında virüsün izole edilmesine rağmen, bu örneklerde izolasyon mümkün olmamıştır.

Viral antijenlerin direkt tanımlanması hızlı ve kolay bir yöntemdir. Ancak diğer solunum yolu viruslarının aksine adenoviruslar için duyarlılığı düşüktür (%50)⁵. DFA testinin özgüllüğünün yüksek olduğu bilinmektedir. DFA testi, PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %36.4 ve %100, hücre kültürüyle karşılaştırıldığında %57 ve %100 olarak bulunmuştur. Örneklerin içerdiği viral yük düşük olduğundan PCR ile kıyaslandığında duyarlılığı düşük, hücre kültürü ile kıyaslandığında ise literatürle uyumludur²². Yüksel ve arkadaşları²³, ASYE olan çocuklarda adenovirus sıklığını DFA yöntemiyle %7.9 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda saptanan DFA pozitiflik oranı ise %2.8'dir.

Hastaların fizik muayenesinde öksürük, farenjit, patolojik solunum sesi varlığı (wheezing, ronküs, ral, uzamış ekspirum), ateş yüksekliği, takipne, hırıltılı solunum, respiratuvar distres, tonsillit, ishal, otit ve konjunktivit gibi klinik bulguların olduğu görülmüştür. Yüksek ateş hariç diğer bulgular adenovirus pozitif hastalarda daha fazla görülmekle birlikte, aradaki fark hiçbir değişkende anlamlı düzeyde bulunmamıştır ($p > 0.05$). Sadece tonsillit, adenovirus pozitif hastalarda istatistiksel olarak sınır değerinde daha yüksektir ($p = 0.05$). Videla ve arkadaşları²⁴, solunum sinsityal virusu (RSV) ve adenovirus etkenli ASYE olan çocukları karşılaştırmışlar ve klinik bulgular arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Hastaların eşlik eden kronik hastalıklarının varlığı, solunum sistemi enfeksiyonlarının sıklığını ve ciddiyetini artırmaktadır. Ancak çalışmamızda eşlik eden kronik hastalıkların adenovirus enfeksiyonlarıyla ilişkisi saptanmamıştır ($p = 0.5$). Kim ve arkadaşları²⁵ Kawasaki hastalığında virusların klinik önemini araştırdıkları çalışmalarında adenoviruslar da dahil hiçbir virüsle anlamlı bir ilişki saptamamışlardır.

Akciğer grafisi çekilen hastalarda adenovirus negatif olan grupta daha yüksek oranda patolojik bulguya rastlanmış, ancak adenovirus pozitif olan sadece bir pnömoni hasta olduğundan bunun yorumlanması doğru bulunmamıştır. Laboratuvar bulgularında CRP, lenfo-

sit, lökosit, trombosit ve nötrofil yüksekliği görülmüş, ancak bu değerlerin yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Farng ve arkadaşları²⁶, adenovirus ve baş- ka etkenlere bağlı pnömonisi olan çocukların klinik bulgularını karşılaştırmışlar; yaş, cinsiyet ve ateş süresi açısından fark bulamamışlar, ancak akciğer dışı bulguların (konjunktivit, ishal, lenfadenopati, CRP) adenovirus pozitif çocuklarda daha sık ($> \%50$) olduğunu belirtmişler- dir. Bu çalışmada da benzer şekilde, akciğer dışı bulgular ve laboratuvar bulguları sayısal de- ğerler olarak yüksek olmakla birlikte aradaki fark anlamlı değildir. Alharbi ve arkadaşları²⁷ adenovirus pozitif ASYE olan çocuklarda ortalama yaşı 11.1 ± 8.1 ay, hastaneye yatış oranı- nı $\%66$, ateş yüksekliğini $\%67$, konjunktivit oranını $\%7$, otitis media oranını $\%10$ ve ishal oranını $\%20$ olarak saptamışlardır. Reina ve arkadaşları²⁸ 1997-2003 yılları arasında 15 ya- şın altındaki (ortalama yaş= 14 ay) çocuklardan aldıkları 5746 solunum yolu örneğinde SV hücre kültürüyle $\%1.7$ oranında adenovirus izole etmişler, hastaların $\%61$ 'inde bronşiyolit, $\%10$ 'unda pnömoni olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada Aralık ve Mart aylarında en- feksiyonun sık görüldüğü, sadece beş hastada ishal şikayeti olduğu, hiçbirinde konjunktivit olmadığı belirtilmektedir. Adenovirus enfeksiyonları yılın her mevsiminde görülebilir, ancak kış ve ilkbahar aylarında sıklığı artmaktadır²⁷. Bu çalışmada adenovirus pozitif örneklerin bü- yük bir kısmı ($\%83.3$) Ocak-Mart aylarında alınmıştır. Sonuçta adenovirus izolasyonu kli- nik bulgular ve mevsimsel dağılım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, ASYE olan çocukların yaklaşık $\%6$ 'sında etiyolojik etken ola- rak adenoviruslar saptanmıştır. Solunum yollarından adenovirus izolasyonunda en önemli basamak kaliteli ve yeterli miktarda örnek alınmasıdır. Esnek *flocked* eküvyonlar çocuklarda nazofarengeal sürüntü örneği alınmasını kolaylaştırmaktadır. Adenovirus enfeksiyonlarının tanısında altın standart hücre kültürü olmakla birlikte, tanıda yüksek duyarlılık ve özgüllü- ğe sahip aynı gün sonuç veren PCR yöntemi kullanılabilir; ancak ekstraksiyon aşamasında yeterli örnek alınıp alınmadığı kontrol edilmelidir. DFA'nın düşük duyarlılığı kullanımını kısı- tlamakla birlikte, örnek kalitesinin bu yöntemle anlaşılabilirliği akılda tutulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Çalışma sürecinde A549 hücrelerinin devamlılığının sağlanmasında desteklerini esir- gemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi başkanı Prof. Dr. Nidai ÖZEŞ'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Langley JM. Adenoviruses. *Pediatr Rev* 2005; 26(7): 244-9.
2. Robinson C, Echavarria M. Adenoviruses, pp: 1589-600. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
3. Bodur E, Yapar M, Şener K. Üst solunum yolu enfeksiyonu yakınmaları olan ilköğretim çağı çocuklarında PZR 70 yöntemi kullanılarak adenovirüs araştırılması. *Gülhane Tıp Derg* 2009; 51(3): 162-7.
4. Ruuskanen O, Meurman O, Akuşjärvi G. Adenoviruses, pp: 515-35. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds), *Clinical Virology*. 2002, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
5. Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8(3): 240-8.
6. Ebner K, Suda M, Watzinger F, et al. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3049-53.

7. Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, et al. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 4072-6.
8. Castro-Rodriguez JA, Daszenies C, Garcia M, et al. Adenovirus pneumonia in infants and factors for developing bronchiolitis obliterans: a 5-year follow-up. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(10): 947-53.
9. Aslan SS, Yılmaz G. Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda adenovirus enfeksiyonu insidansının saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2001; 31(3-4): 242-4.
10. Beka H, Kilic A, Unuvar E, et al. Frequency of common viruses in etiology of acute respiratory tract infections. *Indian J Pediatr* 2013; 80(2): 91-6.
11. Carballal G, Videla C, Misirlan A, Requeijo PV, Aquilar Mdel C. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 2: 6.
12. de Mello Freitas FT. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(1): 62-8.
13. Gao XQ, Jin Y, Xie ZP, et al. The epidemiological study of adenovirus in children with respiratory tract infections in Nanjing area from 2010 to 2011. *Bing Du Xue Bao* 2012; 28(5): 531-5.
14. Ricart S, Marcos MA, Sarda M, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol* 2012; doi: 10.1002/ppul.22633.
15. Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, et al. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3439-43.
16. Debye C, Bulkow L, Miernyk K, et al. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2012; 185(1): 89-93.
17. Munywoki PK, Hamid F, Mutunga M, et al. Improved detection of respiratory viruses in pediatric outpatients with acute respiratory illness by real-time PCR using nasopharyngeal flocked swabs. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9): 3365-7.
18. Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, et al. Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2414-7.
19. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, et al. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6): 1505-8.
20. Mahafzah AM, Landry ML. Evaluation of immunofluorescent reagents, centrifugation and conventional cultures for the diagnosis of adenovirus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12(5): 407-11.
21. Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, et al. Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63(5): 338-41.
22. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004; 113(1 Pt 1): e51-6.
23. Yüksel H, Yılmaz Ö, Akçali S, et al. Common viral etiologies of community acquired lower respiratory tract infections in young children and their relationship with long term complications. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(3): 429-35.
24. Videla C, Carballal G, Misirlan A, et al. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(1): 17-23.
25. Kim JH, Yu JJ, Lee J, et al. Detection rate and clinical impact of respiratory viruses in children with Kawasaki disease. *Korean J Pediatr* 2012; 55(12): 470-3.
26. Farnig KT, Wu KG, Lee YS, et al. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35(1): 37-41.
27. Alharbi S, Van Caeseele P, Consunji-Araneta R, et al. Epidemiology of severe pediatric adenovirus lower respiratory tract infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 55.
28. Reina J, Ferres F, Gutierrez O, et al. Study of clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections by adenovirus in a pediatric population (1997-2003). *An Pediatr (Barc)* 2004; 61(2): 137-42.
29. 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.