

Akut Flask Paralizi Şüpheli Olguların Dışkı Örneklerinden Adenovirus İzolasyon Sıklığının Araştırılması

Investigation of Adenovirus Isolation Frequency from the Stool Samples of Patients Suspected with Acute Flaccid Paralysis

Fatma BAYRAKDAR, Yasemin COŞGUN, Tunca SALMAN ATAK, Hülya KARADEMİR, Gülay KORUKLUOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Viroloji Bölümü, Ankara.
Public Health Institution of Turkey, Microbiology Reference Laboratories Department of Virology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.10.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.03.2016

ÖZ

Adenovirüsler, çoğunlukla üst solunum yolu hastalığı, konjonktivit/epidemik keratokonjonktivit, gastroenterit ve pnömoni gibi enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, merkezi sinir sistemi tutulumuna da yol açabilirler. Akut flask paralizi (AFP), sıklıkla 15 yaşın altındaki çocuklarda görülen ve genellikle el, ayak, nadiren de solunum yolları ve sindirim sistemi kaslarında, hızlı ve ani gelişen, kasların tonus kaybettiği bir felç tipidir. AFP'nin başlıca viral etkeni poliovirüslerdir; ancak polio-dışı enterovirüsler, kabakulak virüsü, kuduz virüsü ve flavivirüsler de AFP kliniği oluşturabilmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmaların verileri, adenovirüslerin AFP etiolojisindeki olası rollerini işaret etmektedir. Bu çalışmanın amacı, AFP şüpheli olguların ve temaslılarının dışkı örneklerinden adenovirus (AdV) izolasyon sıklığının araştırılmasıdır. Çalışmada, poliomiyelitin takibi için yapılan AFP sürveysi kapsamında, 2000-2014 yılları arasında, ülkemizin farklı bölgelerindeki sağlık kuruluşlarından, 0-15 yaş arasındaki AFP şüpheli olgular (n= 3185) ve bunların temaslılarından (n= 2945) alınarak laboratuvarımıza gönderilen toplam 6130 dışkı örneği, AdV izolasyonu açısından retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Dışkı örnekleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği algoritma doğrultusunda analiz edilmiş ve Hep-2, RD ve L20B hücre kültürlerine ekilmiştir. Enterovirüslerden farklı olarak, L20B hücre kültürlerinde AdV'lar için karakteristik sitopatik etkinin saptandığı örnekler, ticari bir aglütinasyon yöntemiyle (Diarlex Adeno; Orion Diagnostica, Finlandiya) doğrulanmıştır. Çalışmamızda, örneklerin %1.6'sından (97/6130) AdV izolasyonu yapılmış; AdV pozitif örneklerin %76.3'ünün (74/97) AFP şüpheli olgulara, %23.7'sinin (23/97) temaslı olgulara ait olduğu saptanmıştır. Buna göre AFP şüpheli olguların %2.3'ünden (74/3185), temaslıların ise %0.8'inden (23/2945) AdV izole edilmiştir. Adenovirus pozitiflik oranlarının, hastalar ve temaslıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir (Z skoru 4.8347; p< 0.05). AdV varlığı saptanan AFP şüpheli olguların

İletişim (Correspondence): Dr. Bio. Fatma Bayrakdar, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Lab. Daire Başkanlığı, Viroloji Bölümü, Adnan Saygun Cad. No:55, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 565 5564, **E-posta (E-mail):** fbayrakdar@windowslive.com

%52.6'sının 1-4 yaş grubunda olduğu ve pozitifliğin erkeklerde kadınlara oranla 1.6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın verileri, AdV'ların AFP ile olan ilişkisini destekleyen çalışmalarla uyumlu olsa da, daha ileri moleküler ve klinik araştırmalara gereksinim olduğu açıktır.

Anahtar sözcükler: Adenovirus; akut flask paralizi.

ABSTRACT

Although adenoviruses (AdVs) generally cause upper respiratory tract infections, conjunctivitis/epidemic keratoconjunctivitis, gastroenteritis and pneumonia, they can lead to the involvement of central nervous system. Acute flaccid paralysis (AFP) is a type of seizure, characterized by rapid and sudden onset of extreme weakness in hands and feet, including (less frequently) weakness of respiratory and swallowing, representing with decreased muscle tone, especially in children below 15-year-old. The major viral cause of AFP is polioviruses, however non-polio enteroviruses, mumps virus, rabies virus and flaviviruses can also be responsible for AFP. The data of some recent studies have pointed out the probable aetiological role of AdVs in AFP. The aim of this study was to investigate the frequency of AdVs from stool samples of AFP-suspected patients and their contacts. A total of 6130 stool samples from patients (age range: 0-15 years) prediagnosed as AFP (n= 3185) and their contacts (n= 2945), which were sent to our laboratory from the health care centers located at different regions of Turkey for the monitorization of poliomyelitis as part of national AFP surveillance programme, between 2000-2014, have been retrospectively evaluated in terms of adenovirus isolation frequency. Samples were analyzed according to the algorithm recommended by World Health Organization and inoculated in Hep-2, RD, and L20B cell lines for cultivation. Apart from enteroviruses, in case of the presence of characteristic cytopathic effects for AdVs observed in L20B cells were confirmed by a commercial Adeno agglutination kit (Diarlex Adeno; Orion Diagnostica, Finland). It was noted that AdVs have been isolated from 1.6% (97/6130) of the samples, and out of positive samples 76.3% (74/97) were from AFP-suspected cases, while 23.7% (23/97) were from their contacts. Accordingly the frequencies of AdVs from AFP-suspected cases and their contacts were found as 2.3% (74/3185) and 0.8% (23/2945), respectively. The frequencies of Adenovirus positivity between the patients and their contacts were statistically significant (Z-Score 4.8347; $p < 0.05$). It was determined that 52.6% of the detected AdVs among AFP-suspected cases were between 1-4 age group and the positivity was 1.6 times more among males than the females. Although the data of this study are in agreement with the studies that support the relationship of AdVs with AFP, it is obvious that further molecular and clinical studies are needed.

Keywords: Adenovirus; acute flaccid paralysis.

GİRİŞ

İnsan adenovirusları, *Adenoviridae* ailesi *Mastadenovirus* cinsinde yer alan, çıplak, iközahedral kapsidli, çift iplikli DNA virusları olup, yedi tür (A-G) ve 67 tipten oluşmaktadır¹. Tüm dünyada yaygın olarak görülen insan adenovirus (HAdV) enfeksiyonları, çoğunlukla üst solunum yolu hastalığı, keratokonjonktivit, pnömoni, sistit ve gastroenterit şeklinde seyretmekle birlikte, bazı tipler merkezi sinir sistemi tutulumuna da yol açabilmektedir¹⁻³.

Akut flask paralizi (AFP), 15 yaşın altındaki çocuklarda görülen ve genellikle el, ayak, nadiren de solunum yolları ve sindirim sistemi kaslarında, hızlı ve ani gelişen, kasların tonus kaybettiği bir felç tipidir⁴. AFP'nin başlıca viral etkeni polioviruslardır; ancak polio-dışı enteroviruslar (koksaki viruslar, ekoviruslar, enterovirus 71, enterovirus D68, vb), kabakulak virusu, kuduz virusu ve flaviviruslar (Batı Nil virusu, Japon ensefaliti virusu, kene ensefaliti

virusu, vb) da AFP kliniği oluşturabilmektedir⁵⁻⁷. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, AFP'li olguların dışkı ve diğer klinik örneklerinde bazı adenovirus tiplerinin saptanması, bu virusların AFP etiyojisindeki olası rollerini düşündürmeye başlamıştır⁸⁻¹³. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada, AFP şüpheli olguların dışkı örneklerinden adenovirus izolasyon sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Laboratuvarımızda poliomyelitin takibi için yapılan AFP sürveyansı kapsamında, vahşi tip poliovirus ve diğer enterovirusların yanı sıra, adenovirusların izolasyon ve tanımlama çalışmaları da yapılmaktadır. Bu amaçla, ülkemizin her bölgesindeki farklı sağlık kuruluşlarından, AFP şüpheli olgular ve bunların temaslılarından, 24-48 saat arayla iki kez alınan dışkı örnekleri, soğuk zincir şartlarında, vidalı kapaklı kaplarda laboratuvarımıza gönderilmektedir. Bütün örnekler, ön hazırlık işlemleri sonrası, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün¹⁴ insan enterovirusları için önerdiği algoritma doğrultusunda analiz edilmekte ve izolasyon için Hep-2 (human epithelial type 2), RD (human rhabdomyosarcoma cell) ve L20B (mouse cell lines) hücre kültürlerine ekilmektedir. Hücre kültürlerinde poliovirus ve diğer enterovirusların dışında, adenovirus (AdV) için karakteristik sitopatik etki (CPE)'lerin görüldüğü örnekler (AdV'lar, L20B hücre kültürlerinde enteroviruslardan belirgin olarak farklı CPE oluşturur¹⁴), ticari bir aglütinasyon kiti (Diarlex™ Adeno, Orion Diagnostica, Finlandiya) kullanılarak doğrulanmaktadır.

Bu çalışmada, 2000-2014 yılları arasında, 0-15 yaş arasındaki AFP şüpheli olgular (n= 3185) ve bunların temaslılarından (n= 2945) alınarak laboratuvarımıza gönderilen toplam 6130 dışkı örneği, AdV izolasyonu açısından retrospektif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, dışkı örneklerinin 94'ünden tek başına, 3'ünden ise enteroviruslarla birlikte olmak üzere toplam 97 (97/6130; %1.6) örnekte AdV izolasyonu yapılmıştır. AdV pozitif örneklerin %76.3'ü (74/97) AFP şüpheli olgulara, %23.7'si (23/97) temaslı olgulara aittir. Buna göre AFP şüpheli olguların %2.3'ünden (74/3185), temaslıların ise %0.8'inden (23/2945) AdV izole edilmiştir. Adenovirus pozitiflik oranlarının, hastalar ve temaslılar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir (Z skoru 4.8347; p değeri < 0.05). AdV varlığı saptanan AFP şüpheli olguların %52.6'sının 1-4 yaş grubunda olduğu (Tablo I) ve pozitifliğin erkeklerde kadınlara oranla 1.6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. AdV pozitif AFP olguları ve temaslılarının yıllara göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Akut flask paralizi (AFP), enfeksiyöz olan ve olmayan birçok etkene bağlı olarak görülebilmekle birlikte, en önemli viral etken polioviruslardır¹⁵. Vahşi tip poliovirusların dünyanın birçok bölgesinden eradike edilmesine rağmen, bu bölgelerden halen AFP olgularının rapor edilmesi, başta polio-dışı enteroviruslar olmak üzere diğer virusların da AFP'ye neden olma sıklığının yüksek olduğunu vurgulamaktadır^{5-7,16-18}. Adenovirusların AFP ile

Tablo I. Adenovirus tespit edilen olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş	AFP olguları Sayı (%)	Temaslılar Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
≥ 1	9 (9.3)	4 (4.1)	13 (13.4)
1-4	43 (44.3)	8 (8.2)	51 (52.6)
5-15	18 (18.6)	7 (7.2)	25 (25.8)
Bilinmeyen	4 (4.1)	4 (4.1)	8 (8.2)
Toplam	74 (76.3)	23 (23.7)	97 (100)

Tablo II. 2000-2014 yılları arasında AFP şüpheli olgularında ve temaslılarında tespit edilen adenovirus pozitif örnek sayısının yıllara göre dağılımı

Yıllar	AFP şüpheli olgu	Temaslı olgu	Toplam
2000	2	1	3
2001	2	2	4
2002	8	2	10
2003	6	3	9
2004	7	3	10
2005	7	3	10
2006	3	2	5
2007	10	1	11
2008	3	1	4
2009	2	1	3
2010	3	2	5
2011	8	0	8
2012	4	0	4
2013	5	2	7
2014	4	0	4
Toplam	74	23	97

ilişkisi, Ooi ve arkadaşlarının⁸, enterovirus 71'e bağlı bir el-ayak-ağız hastalığı epidemisi sırasında, sekiz çocukta AdV-21'e bağlı AFP olgularını rapor etmesiyle gündeme gelmiştir. Daha sonra Azevedo ve arkadaşları⁹, 2004 yılında yayınlanan çalışmalarında, poliomyelit şüpheli hastalardan elde edilen 64 AdV izolatının dizi analizini yapmış ve izolatların AdV A (n= 3), B (n= 20), C (n= 38), D (n= 2) ve E (n=1) türlerine ait olduğunu göstermişlerdir. Avusturalya Ulusal Polio Referans Laboratuvarının 2004 yılı raporunda, AFP olgularından %23 oranında AdV izole edildiği, monovalan antiserumlar ile tiplendirildiğinde bunların HAdV C türü serotip 1, 2, 5 ve HAdV E türü serotip 4 olduğu bildirilmiştir¹⁰. Victoria ve arkadaşları¹¹, polio-dışı AFP'li 35 çocuğun dışkı örneklerini metagenomik olarak analiz etmişler ve *Picornaviridae* ailesinin birçok üyesinin yanı sıra adenovirusların varlığını da tespit etmişlerdir. Ivanova ve arkadaşları¹³, 2012 yılında yayınlanan çalışmalarında, AFP'li

küçük çocukların dışkı örneklerinde %1, temaslılarında ise %0.4 oranında AdV varlığı tespit etmişler; bunların %85'inin HAdV-C türü olduğunu bildirmişlerdir.

Adenovirusların AFP ile ilişkisini sorgulayan bu çalışmaların ışığında, bizim çalışmamızda da AFP şüpheli olguların dışkı örneklerinden AdV izolasyon sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen 0-15 yaş arasındaki AFP şüpheli olguların %2.3'ünden (74/3185), temaslıların ise %0.8'inden (23/2945) AdV izolasyonu yapılmıştır. AdV varlığı saptanan AFP şüpheli olguların %52.6'sının 1-4 yaş grubunda olduğu ve en sık AdV izolasyonunun 2007 yılında gerçekleştiği izlenmiştir (Tablo I,II). AdV pozitif örneklerin %76.3'ünün (74/97) AFP şüpheli olgulara, %23.7'sinin (23/97) ise temaslı olgulara ait olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Temaslı olgularda saptanan bu oran, kişinin immün sisteminin yeterliliğine bağlı olarak, virusun sindirim sisteminde asemptomatik olarak bulunabileceğini göstermektedir. Ivanova ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında da, sağlıklı küçük çocuklarda dışkı ile virus salınım oranı %12-57 arasında bildirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, poliomyelit takibi için yapılan AFP süreyansı kapsamında, laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinde AdV izolasyon oranları retrospektif olarak değerlendirilmiş ve AFP şüpheli olgularda AdV pozitifliği anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Verilerimiz, AdV'ların AFP ile olan ilişkisini destekleyen çalışmalarla uyumlu olsa da, daha ileri moleküler ve klinik araştırmalara gereksinim olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

1. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2014; 4(1): 26-33.
2. Huang YC, Huang SL, Chen SP, et al. Adenovirus infection associated with central nervous system dysfunction in children. *J Clin Virol* 2013; 57(4): 300-4.
3. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(3): 441-62.
4. Rasul CH, Das PL, Alam S, Ahmed S, Ahmed M. Clinical profile of acute flaccid paralysis. *Med J Malaysia* 2002; 57(1): 61-5.
5. Solomon T, Kneen R, Dung NM, et al. Poliomyelitis-like illness due to Japanese encephalitis virus. *Lancet* 1998; 351(9109): 1094-7.
6. Abbasian F, Saberbaghi T, Moosapour A. Role of non-polioviruses in acute flaccid paralysis (AFP). *J Gastroenterol Hepatol Res* 2012; 1(4): 44-8.
7. Macesic N, Hall V, Mahony A, et al. Acute flaccid paralysis: the new, the old, and the preventable. *Open Forum Infect Dis* 2015; 3(1): ofv190.
8. Ooi MH, Wong SC, Clear D, et al. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Infect Dis* 2003; 36(5): 550-9.
9. de Azevedo JP, Nascimento LR, Cortinovis MC, Oliveira SS, da Costa EV, da Silva EE. Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases. *J Clin Virol* 2004; 31(4): 248-52.
10. Stambos V, Brussen KA, Thorley BR. Annual report of the Australian National Poliovirus Reference Laboratory, 2004. *Commun Dis Intell Q Rep* 2005; 29(3): 263-8.
11. Victoria JG, Kapoor A, Li L, et al. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol* 2009; 83(9): 4642-51.

12. Belsy A, Odalys V, Alexander P, et al. Molecular characterization of adenoviral infections in Cuba: report of an unusual association of species D adenoviruses with different clinical syndromes. *Arch Virol* 2009; 154(4): 619-27.
13. Ivanova OE, Yurashko OV, Ereemeeva TP, Baikova OY, Morozova NS, Lukashev AN. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients. *J Med Virol* 2012; 84(1): 75-80.
14. World Health Organization. Polio Laboratory Manual. 2004, 4th ed. WHO, Geneva, Switzerland. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68762/1/WHO_IVB_04.10.pdf
15. de Quadros CA, Hersh BS, Olivé JM, Andrus JK, da Silveira CM, Carrasco PA. Eradication of wild poliovirus from the Americas: acute flaccid paralysis surveillance, 1988-1995. *J Infect Dis* 1997; 175 Suppl 1: S37-42.
16. Marx A, Glass JD, Sutter RW. Differential diagnosis of acute flaccid paralysis and its role in poliomyelitis surveillance. *Epidemiol Rev* 2000; 22(2): 298-316.
17. Saraswathy Subramaniam TS, Apandi MA, Jahis R, Samsudin MS, Saat Z. Viral aetiology of acute flaccid paralysis surveillance cases, before and after vaccine policy change from oral polio vaccine to inactivated polio vaccine. *J Trop Med* 2014; 2014: 814908.
18. Solomon T, Willison H. Infectious causes of acute flaccid paralysis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(5): 375-81.