

Akut Konjunktivitli Olgularda İnsan Adenovirüslerinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu

Detection and Molecular Characterization of Human Adenoviruses from Acute Conjunctivitis Cases

Seda TEZCAN ÜLGER¹, Aslıhan BEKÇİ¹, Ayça YILMAZ², Gönül ASLAN¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, Mersin, Turkey.

* Bu çalışmaya ait ilk veriler XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur. Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "2015-TP2-1226" nolu proje olarak desteklenmiştir.

Makale Atfı: Tezcan Ülger S, Bekçi A, Yılmaz A, Aslan G. Akut konjunktivitli olgularda insan adenovirüslerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):297-307.

ÖZ

İnsan adenovirüsleri (hAdV), çocuklarda ve erişkinlerde esas olarak solunum, göz ve gastrointestinal sistemleri etkileyen oldukça geniş kapsamda klinik hastalıklara neden olabilmektedir. Oküler hAdV enfeksiyonları ise epidemik keratokonjunktivit, faringokonjunktival ateş ve özgül olmayan foliküler konjunktivit gibi çeşitli klinik görünümüne sahiptir. Konjunktivite neden olan hAdV genotipleri ise coğrafi dağılıma göre değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada, klinik olarak akut konjunktivit tanısı konulan hastalardan alınan konjunktival sürüntü örneklerinde, hAdV varlığının moleküler yöntemlerle araştırılarak sıklığının belirlenmesi ve filogenetik analizi yapılarak tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Eylül 2014-Temmuz 2017 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran 100 adet akut konjunktivitli hastadan alınan ve kontrol olarak 50 adet sağlıklı bireylere ait konjunktival sürüntü örneği dahil edilmiştir. Sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu takiben hAdV genomunun hekson gen bölgesini hedefleyen özgül primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. hAdV tiplerinin belirlenmesi için ise hekson gen ürünlerinin direkt DNA dizi analizi "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hAdV DNA dizilerinin BLAST analiziyle tiplendirilmesi yapılmıştır ve belirlenen genotipler "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" referans hAdV dizileri ile filogenetik olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada akut konjunktivitli hastalara ait sürüntü örneklerinin 30 (%30, 30/100)'unda hAdV hekson gen PCR'yi pozitif olarak tespit edilmiştir. Kontrol olarak dahil edilen bireylere ait konjunktival sürüntü örneklerinde ise hAdV DNA'sına rastlanmamıştır. Hekson geni PCR'yi pozitif bulunan 27 örnek direkt DNA dizi analizi ile genotiplendirilmiştir. Toplam beş genotip belirlenmiştir ve en fazla görülen genotipler sırasıyla hAdV-8 (n= 17, %63), hAdV-53 (n= 4, %14.8), hAdV-4 (n= 4, %14.8), hAdV-7 (n= 1, %3.7) ve

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Seda Tezcan Ülger, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, Yenişehir 33343 Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (324) 361 0684-29100 **E-posta (E-mail):** tezcanseda@mersin.edu.tr

hAdV-37 (n= 1, %3.7) olarak belirlenmiştir. Çalışmada akut konjunktivit klinik tanısı konulan hastalarda hekzon geni PCR ile belirlenen adenoviral konjunktivitinin prevalansı dünyanın diğer bölgelerinde bildirilen prevalans oranına benzer bulunmuştur. Bölgemizde birden fazla hAdV tipi akut konjunktivit ile ilişkili bulunmuştur. Çalışma sonunda predominant tip %63 oranı ile hAdV-8 olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar konjunktivitli olgularda hAdV tiplerinin moleküler epidemiyolojisine önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: İnsan adenovirüsleri (hAdV); konjunktivit; genotip; filogenetik analiz.

ABSTRACT

Human adenovirus (hAdV) can cause a wide range of clinical diseases in children and adults that mainly affect respiratory, eye and gastrointestinal systems. Ocular hAdV infections have various clinical manifestations such as epidemic keratoconjunctivitis, pharyngoconjunctival fever and non-specific follicular conjunctivitis. The hAdV genotypes which can cause conjunctivitis vary according to geographic distribution. In the study, we aimed to determine the frequency of the presence of hAdV by molecular methods and to determine the types with phylogenetic analysis in conjunctival swab samples taken from patients diagnosed clinically as acute conjunctivitis. Conjunctival swab samples (n= 100) were taken from the patients with acute conjunctivitis who have admitted to Mersin University Faculty of Medicine Hospital Ophthalmology Clinic and 50 conjunctival swab samples taken from healthy individuals as a control, between September 2014-July 2017 were included in the study. Following the DNA isolation from swab samples, polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using specific primer sequences targeting the hexon gene region of the hAdV genome. In order to determine hAdV types, direct DNA sequence analysis of hexon gene products was performed in "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The obtained hAdV DNA sequences were typed by BLAST analysis and the identified genotypes were compared phylogenetically with the reference hAdV sequences of the NCBI. In the study, 30 (30%, 30/100) of the swab samples of the patients with acute conjunctivitis were found positive for hAdV hexon gene PCR. The hAdV DNA was not found in the conjunctival swab samples belonging to the healthy individuals included as controls. A total 27 samples found as positive of the hexon gene PCR were genotyped by direct DNA sequence analysis. A total of 5 genotypes were identified and the most common genotypes were hAdV-8 (n= 17, 63%) and followed by hAdV-53 (n= 4, 14.8%), hAdV-4 (n= 4, 14.8%), hAdV-7 (n= 1, 3.7%) and hAdV-37 (n= 1, 3.7%). In this study, the prevalence of adenoviral conjunctivitis determined by hexon gene PCR in patients with clinical diagnosis of acute conjunctivitis was similar to the prevalence rate reported in other regions of the world. In our region, more than one type of hAdV type was associated with acute conjunctivitis. The predominant type was determined as hAdV-8 with a 63% ratio. These results will significantly contribute to the molecular epidemiology of hAdV types in conjunctivitis cases.

Keywords: Human adenoviruses (hAdV); conjunctivitis; genotype; phylogenetic analysis.

GİRİŞ

İnsan adenovirüsleri (hAdV) gastroenterit, hepatit, miyokardit ve pnömoni gibi bir dizi hastalığa neden olabilmekte, akut viral konjunktivitlerin ise önde gelen etkenlerinden biridir¹. Dünya genelinde tüm konjunktivit olgularının %15-70'inden hAdV'lerin sorumlu olduğu belirtilmektedir².

Adenovirüsler *Adenoviridae* ailesi içinde *Mastadenovirus* cinsinde yer almaktadır ve ikoza-hedral simetrik, zarfsız, çift-zincirli DNA virüsleridir. AdV'ler altı türe (A-F) ayrılmaktadır ve ortak antijenik determinanta sahip 50'den fazla serotipinin olduğu bilinmektedir^{1,3}. Oküler adenoviral enfeksiyonun en yaygın bulgusu epidemik keratokonjunktivit ve bunu takip eden faringokonjunktival ateştir¹. hAdV serotiplerinin yaklaşık 1/3'ünün, adenoviral göz enfeksiyonlarının yaygın formları ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. hAdV-8, -19 ve -37 serotipleri sıklıkla epidemik keratokonjunktivit ile ilişkili olup, hAdV-2, -3, -4, -5, -7, -10, -11, -21, -22, -29 ve -34 gibi diğer serotipler de bu hastalık ile ilişkilidir³.

Birçok epidemik keratokonjunktivit salgını toplum kökenlidir ve kişiden kişiye solunum ve oküler sekresyonların direkt teması, parmaklarının veya kontamine oftalmik aletlerin gözle teması ile taşınmaktadır. Salgınlarda özellikle yetersiz klorlanmış yüzme havuzları veya kontamine oftalmoloji üniteleri yaygın enfeksiyon kaynağı olabilmektedir⁴. Adenoviral konjunktivit bifazik bir hastalık olup, virüsün yayılmaya başladığı enfeksiyonun başlangıcındaki enfektif fazı takiben 7-10 gün sonra başlayan enflamatuvar faz ile devam etmektedir. Hasta 2-3 haftaya kadar enfeksiyöz kalmaktadır¹.

Bu viral enfeksiyonun laboratuvar tanısında, viral kültür, antijen tespiti, seroloji ve nükleik asit tespiti gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir³. Duyarlı bir hücre dizisinde sitopatik etkinin görülmesi ile virüs izolasyonu altın standarttır. Virüs izolasyonu kesindir ve ileri karakterizasyona imkan vermesine rağmen, transport besiyerine ihtiyaç duyulması, maliyeti ve pozitif sonuçların uzun süre sonunda sonuçlanması dezavantajları olarak kabul edilmektedir⁵. Diğer yandan santrifüj ve immünfloresan antikor tekniğinin birlikte kullanıldığı "shell vial" hücre kültür yöntemi ile pozitif kültürlerin süresi geleneksel hücre kültür yöntemlerine göre belirgin biçimde kıaldığı bildirilmiştir⁶. hAdV'lerin antijen tespiti için immünokromatografi ve "Enzyme Linked Immunoasorbent Assay (ELISA)"ın duyarlılık ve özgüllüğü değişken olarak belirtilmiş olup, her iki yöntemin uygulaması kolay ancak hasta başı test olarak immünokromatografi daha hızlı sonuç vermektedir⁷. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile nükleik asit tespiti diğer virolojik yöntemlerden daha duyarlı olup, canlı virüsün bulunmasına ve kültürde yaklaşık olarak enfekte olan hücre sayısına bağlı olmaması gibi avantajları nedeni ile son zamanlarda tercih edilen bir yöntemdir³.

hAdV'ler konjunktivitinin en yaygın nedeni olup, olgularda hAdV sıklığı ve genotip dağılımı virüsün coğrafik dağılımına göre değişkenlik göstermektedir. Ülkemizde ise oküler adenoviral enfeksiyonlar ve genotip dağılımı ile ilgili olarak oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran ve klinik olarak akut konjunktivit tanısı konulan hastalardan alınan konjunktival sürüntü örneklerinde, hAdV varlığının moleküler olarak araştırılarak sıklığının belirlenmesi ve filogenetik analizi yapılarak tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 26.02.2015 ve Karar no: 2015/65). Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi, yapılacak çalışma ile ilgili olarak önceden bilgilendirildi.

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya Eylül 2014-Temmuz 2017 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran akut konjunktivitisli 100 hastadan alınan ve kontrol olarak 50 adet sağlıklı bireylere ait konjunktival sürüntü örneği dahil edildi. Bunun için steril serum fizyolojik ile ıslatılmış eküvyon konjunktiva üzerinde çevrilerek, alt konjunktiva kesesinden veya forniks sürülerek örnekleme yapıldı. Hastalardan alınan sürüntü örneği eküvyon ile birlikte virüs taşıma besiyerine (%0.2 sığır albumin, 100 U penisilin ve 0.01

µg streptomisin/ml) alındı. Besiyerinde bulunan örnek iyice vorteksenerek ikişer adet 1.5 ml'lik steril plastik tüplere alındı ve çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

Konjunktival Sürüntü Örneklerinden DNA İzolasyonu

Sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu için "High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)" kiti kullanıldı. Ekstraksiyon aşamaları ve kullanılan çözeltilerin hazırlanması üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

hAdV Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu

Bu amaçla hAdV genomununun hekson gen bölgesinin 463 baz çifti (bp) uzunluğundaki bir bölümünü hedefleyen spesifik primer dizileri kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir⁸.

Her bir örneğin PCR amplifikasyonu 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 5 µl 10XPCR tampon, 2.5 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl örnek DNA'sı içerecek şekilde hazırlandı. Örneklerin ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları, 94°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 40 döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 55°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1.5 dakika uzama basamaklarını takiben 70°C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinden sonra 0.5 µg/ml etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilüminatörde görüntülendi.

hAdV Tiplendirilmesi

Amplifiye olan AdV hekson gen PCR ürünleri, işaretli dideoksinükleotitleri içeren "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak, sense ve antisense zincirleri hAdV-F ve hAdV-R primerleri ile "Cycle Sequence" PCR yapıldı. Reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi, "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirildi. Kromatografi şeklinde elde edilen her örneğe ait sense ve antisense dizi analizi verileri CLUSTAL X versiyon 1.83 yazılım programı ile hizalandıktan sonra ve GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor&Shading Utility) yazılım programı ile konsensus dizi olarak kaydedildi. Konsensus diziler, PubMed-BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) programına yüklenerek, Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans hAdV dizi verileri ile karşılaştırılarak olası hAdV tiplendirilmesi yapıldı.

Tablo 1. hAdV Hekzon Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Primerlerin Oligonükleotid Dizileri

Primerler	Oligonükleotid dizileri (5'-3')	Amplifiye edilen bölge	Hedef bölge uzunluğu (bp)
hAdV-F (Sense)	TGGCYWSCACNTWCTTTGACATYMG	nt. 19121-19184	463
hAdV-R (Antisense)	GCRWAWGAHCCRTARCAKGGYDCAT	nt. 19492-19584	

(M, A/C; R, A/G; W, A/T; S, C/G; Y, C/T; K, G/T; V, A/C/G; H, A/C/T; D, A/G/T; N, A/C/G/T.)

* NCBI referans no: AC_000007.1; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Filogenetik Analiz

Hasta örneklerinden 27 tanesi ve yedi referans NCBI (National Center for Biotechnology Information) dizisi (3'ü hAdV-8, diğerleri hAdV-4, hAdV-7, hAdV-37 ve hAdV53) olmak üzere toplam 34 dizinin filogenetik karşılaştırması MEGA versiyon 7.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Dizi analizinden elde edilen hekson gen bölgesi dizisi CLUSTAL X programında, referans diziler ile toplu bir şekilde hizalandıktan sonra, GENEDOC programında gerekli düzeltmeler yapıldı. Filogenetik ağaç MEGA versiyon 7.0 yazılım programı kullanılarak "Neighbor-Joining" yöntemi ile oluşturuldu.

NCBI dizilerinin GenBank erişim numaraları: hAdV-4: KR090805.1; hAdV-7: KR090819.1; hAdV-D8: AB685335.1, LC129005.1, KU170735.1; hAdV-37: AY056459; hAdV-53: LC128897.1.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen klinik olarak konjunktivit tanısı konulmuş 100 hastanın 58'i kadın ve 42'si erkek olup yaş ortalaması 34.02 ± 16.87 (yaş aralığı: 1-77 yıl) olarak belirlenmiştir. Kadın hastaların yaş ortalaması 33.34 ± 17.60 (yaş aralığı: 1-77 yıl) iken, erkek hastaların yaş ortalaması 34.97 ± 15.93 (yaş aralığı: 1-66 yıl) olarak saptanmıştır. Kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen 50 bireyin 27'si kadın ve 23'ü erkek olup yaş ortalaması 29.84 ± 7.58 (yaş aralığı: 19-44 yıl) olarak belirlenmiştir. Kadınların yaş ortalaması 27.19 ± 7.27 (yaş aralığı: 19-40 yıl) iken, erkeklerin yaş ortalaması 29.45 ± 6.79 (yaş aralığı: 23-44 yıl) olarak tespit edilmiştir.

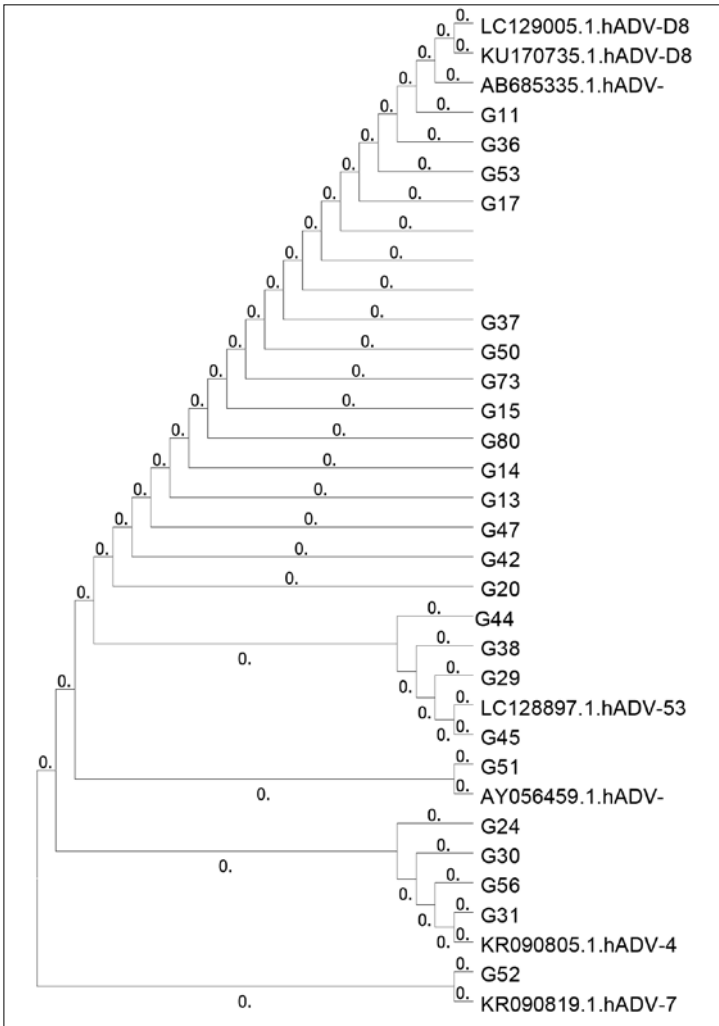
Çalışmada klinik olarak konjunktivit tanısı konulan hastalara ait konjunktival sürüntü örneklerinin 30 (%30, 30/100)'unda hAdV hekson gen PCR pozitif olarak tespit edilmiştir (Resim 1). Kontrol olarak çalışmaya dahil edilen sağlıklı bireylere ait konjunktival sürüntü örneklerinde pozitiflik saptanmamıştır.



Resim 1. hAdV hekson geni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M; Moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Thermo Fisher Scientific), 1,2,3,4,5 nolu kolonlar; hAdV pozitif örneklerin PCR ürünleri (~463 bp), 6,7,8 nolu kolonlar; hAdV negatif örneklerin PCR ürünleri, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif kontrol.

Pozitif hastaların 17 (%56.7, 17/30)'si Aralık ve 7 (%23.3, 7/30)'si Kasım, 3 (%10, 3/30)'ü Eylül ve diğerleri tek olgular halinde Ekim (%3.3, 1/30), Şubat (%3.3, 1/30) ve Mayıs (%3.3, 1/30) ayında hastaneye başvurmuştur. Pozitif bulunan 30 hastanın 11'i erkek, 19'u kadın ve yaş ortalaması 29.75 ± 12.89 (yaş aralığı: 2-63) olarak belirlenmiştir.

PCR pozitif bulunan 30 örneğin 27 tanesine DNA dizi analizi yapılmış olup, 3 tanesinin PCR ürünü zayıf olduğu için dizi analizi yapılamamıştır. Dizi analizi verilerinin filogenetik analizi ile en yaygın görülen tipin 17 örnekte belirlenen hAdV-8 (%63) olduğu saptanmıştır. Bunu takip eden diğer tipler ise örneklerin dördünde hAdV-53 (%14.8), dördünde hAdV-4 (%14.8), birinde hAdV-7 (%3.7) ve birinde hAdV-37 (%3.7) olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. 27 hasta ve 7 NCBI veritabanı hAdV hekson gen bölgesinin "neighbor-joining" karşılaştırma yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.

TARTIŞMA

Konjunktivit oftalmoloji kliniklerde en sık gözlenen hastalıklardan biridir. Konjunktivit ile ilişkisi tanımlanmış virüslerden birisi Enterovirüs cinsi içinde yer alan Enterovirus 70 ve Coxsackievirus A24'ün bir varyantı olup, AdV'ler akut konjunktivit olgularının önde gelen nedenidir³.

Ülkemizde akut konjunktivitli olgularda hAdV prevalansının ve genotip dağılımının belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda AdV'lerin konjunktivitli olgularda görülme oranı %26.5-72 arasında değişmektedir⁹⁻¹². Yaptığımız çalışmada da, hekson genini hedefleyen primerin kullanıldığı PCR ile konjunktival sürüntü örneklerinin %30 (30/100)'unda hAdV DNA'sı tespit edilmiştir. Bu oran hAdV'ün ülkemizde görülme sıklığı aralığı içinde yer almaktadır. Çalışmamız Mersin ilinde akut konjunktivit olgularında hAdV'lerin moleküler epidemiyolojisine yönelik ilk çalışmadır. Adenovirüslerin neden olduğu akut konjunktivit olgularını klinik olarak konjunktivit diğer etiyolojik etkenlerinden ayırmak genelde zordur¹³. Negatif PCR sonuçları olası adenovirüs dışı türler, allerjik konjunktivit, chlamydia inklüzyon konjunktiviti ve daha az yaygın olan herpesvirüsler, picornavirüsler, Epstein-Barr virüs, influenza, paramyxovirus ve poxvirüsleri içerebileceği bildirilmiştir³.

Yağcı ve arkadaşları tarafından Ankara'da 2003-2004 yılları arasında klinik olarak viral konjunktivit tanısı konulan hastalarda yapılan çalışmada⁹, PCR ile %26.5 (9/34) oranında hAdV pozitifliği saptandığı ve filogenetik analiz ile hAdV-8 (%44.4, 4/9), hAdV-3 (%33.3, 3/9), hAdV-4 (%11.1, 1/9) ve hAdV-B (%11.1, 1/9) saptandığı bildirilmiştir. Çiçek ve arkadaşları tarafından İzmir'de 2001 yılında çeşitli klinik örneklerin adenovirüs yönünden hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemiyle izole edildiği ve direkt immünfloresan antikor yöntemiyle tanımlandığı çalışmada¹⁴, konjunktival sürüntü örneklerinde hAdV PCR pozitifliğinin %16.6 (7/42) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hAdV yönünden pozitif bulunan örneklerin hekson genini hedefleyen PCR ve sonrasında tiplendirme için dizi analizi ile araştırıldığı ve örneklerin hepsinin hAdV-8 olarak tiplendirildiği belirtilmiştir. Nalça-Erdin ve arkadaşları tarafından İzmir'de 2006-2010 yılları arasında yapılan bir çalışmada¹⁰ ise, hAdV DNA'sının PCR ile %44 (213/488) oranında belirlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada rastgele seçilen 101 örneğin dizi analizinde hAdV-8 (%66.3, 67/101) ve hAdV-4 (%24.7, 25/101)'ün en dominant tip olduğu ve diğer genotipler olan hAdV-3, hAdV-11, hAdV-19, hAdV-37 ve hAdV-53 (%8.9, 9/101)'ün daha az görüldüğü bildirilmiştir. Akçay ve arkadaşları tarafından Ankara'da 2013-2014 yıllarında yapılan başka bir çalışmada¹¹ hAdV PCR pozitiflik oranı %74.2 (46/62) olarak bildirilmiş olup, genotip tespitine yönelik bir çalışma yapılmadığı bildirilmiştir. Kiraz tarafından 2012 yılında yapılan tez çalışmasında¹² da konjunktival sürüntü örneklerinde hAdV DNA'sının PCR yöntemi ile %46 (23/50) oranında saptandığı bildirilmiş olup, bu çalışmada da tiplendirmenin yapılmadığı görülmüştür.

Görüldüğü gibi, hAdV-8'in ülkemizde oküler lezyonlarda en yaygın görülen genotip olduğu ve dağılımının %44.4-100 arasında değiştiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{9,10,14}. Yaptığımız çalışmada da ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olarak

%63 (17/27) oranında en fazla hAdV-8'in görüldüğü saptanmıştır. Bunu ise sırasıyla; hAdV-53 (%14.8, 4/27), hAdV-4 (%14.8, 4/27), hAdV-37 (%3.7, 1/27) ve hAdV-7 (%3.7, 1/27) genotipleri izlemektedir. hAdV-8'den sonra en yaygın görülen tipin bizim çalışmamız ile uyumlu olarak %11.1-24.7 oranı ile hAdV-4 olduğu yapılan diğer çalışmaların sonuçlarında görülmektedir^{9,10}. Çalışmamızda ayrıca hAdV-7 genotipi ülkemizde ilk defa saptanmıştır. hAdV-7 1973 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kansas eyaletinde bir yüzme takımında epidemik akut konjunktivit olgularında saptanmış olup¹⁵, bu tipin engelli çocukların barındıkları bir yerde ciddi solunum yolu salgınlarından sorumlu tutulduğu bildirilmiştir¹⁶. Bu sebeple ülkemizde, daha fazla örnek sayısı ile adenoviral konjunktivit olgularında genotiplerin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması, ulusal epidemiyolojik verinin birikmesi açısından son derece önemlidir.

Dünya genelinde hAdV'lerinin bütün enfeksiyöz konjunktivit olgularının %39-89'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir^{3,4,17,18-22}. ABD'inde ise, hAdV enfeksiyon insidansının kesin olarak bilinmediği ancak yıllık 20 milyon olgunun gözleendiğinin tahmin edildiği belirtilmektedir⁷. Çin, Beijing'de 2011-2013 yılları arasında 18 hastanenin dahil edildiği akut konjunktivit sürveyans çalışmasında, hekzon geni PCR ile %39.8 (349/876) oranında hAdV pozitifliğine rastlandığı bildirilmiştir. Tüm adenoviral konjunktivit olgularının %81.1'inden beş tipin sorumlu olduğu belirtilmiş olup, en fazla görülen tip %18 oranı ile hAdV-4 olup, bunları hAdV-37 (%17.5), hAdV-53 (%16.9), hAdV-64 (%14.6) ve hAdV-8 (%13.5) izlemektedir¹⁷. Brezilya'da 2011-2012 yıllarında yapılan bir çalışmada klinik olarak enfeksiyöz konjunktivit tanısı konulan hastaların göz sürüntü örneklerinde %59 oranında hAdV DNA'sının saptandığı belirtilmiş olup genotip değerlendirilmesi yapılmamıştır³. Brezilya Rio de Janeiro'da 2004-2007 yılları arasında PCR ile hAdV sıklığını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada ise, %60 oranında hAdV pozitifliğinin saptandığı ve dizi analizi ile pozitif örneklerin %46.7'sinde hAdV-19, %15.5'inde hAdV-8, %6.7'sinde hAdV-31'ün saptandığı ve sadece birer örnekte saptanan diğer tiplerin hAdV-1, hAdV-2, hAdV-3, hAdV-4 ve hAdV-6 olduğu belirtilmiştir¹⁸. Batı Hindistan'da 2013-2014 yıllarında keratokonjunktivitli olgularda yapılan bir çalışmada hAdV DNA pozitifliğinin %60.9 (14/23) oranında saptandığı bildirilmiş olup, hAdV-8'in (%78.6, 11/14) predominant genotip olarak belirlendiği, bunu hAdV-37 (%7.2, 1/14), hAdV-3 (%7.2, 1/14) ve hAdV-4 (%7.2, 1/14)'ün izlediği belirtilmiştir¹⁹. Kuzey Hindistan'da 2014-2015 yılları arasında akut konjunktivitli hastalarda yapılan bir çalışmada ise, hAdV'lerin olguların %65.2 (15/23)'sinde PCR saptandığı bildirilmiş olup, yedi örneğin dizi analizi ile tiplendirildiği ve altısının hAdV-8, birinin hAdV-4 olarak saptandığı bildirilmiştir²⁰. Kuzey Afrika, Tunus'da 2012-2013 yılları arasında yapılan bir çalışmada konjunktivitli olgularda hAdV DNA'sının %65 (156/240) oranında gösterildiği, hAdV-8'in genotiplendirilen örneklerin %87.6 (128/146)'sında predominant genotip olarak saptandığı ve sirküle olan diğer genotiplerin hAdV-4 (%6.8, n= 10), hAdV-3 (%3.5, n= 5), hAdV-55 (%1.3, n= 2) ve hAdV-37 (%0.6, n= 1) olduğu bildirilmiştir²¹. Yunanistan'da 2012 yılında viral konjunktivit olgularının moleküler epidemiyolojisinin nested-PCR ile değerlendirildiği bir çalışmada hAdV sıklığı %83.3 (40/48) olarak bildirilmiş olup, yapılan DNA dizi analizi ile en fazla hAdV-17

(%72.5, 29/40) görüldüğü, görülen diğer tipin hAdV-5 (%12.5, 5/40) olduğu ve kalan örneklerin (%15, 6/40) de tiplendirilemediği bildirilmiştir⁴. Suudi Arabistan'da 2002-2007 tarihleri arasında yapılan çalışmada akut viral konjunktivit şüpheli olgularda PCR ile hAdV DNA'sının %89.04 oranında tespit edildiği ve pozitif örneklerin DNA dizi analizi ile en yaygın görünen tipin %67.1 oranı ile hAdV-8 olduğu, örneklerin %11'inde hAdV-3, %8.2'sinde hAdV-37, %6.8'inde hAdV-4 saptandığı ve diğer tiplerin hAdV-19 (%2.7), hAdV-22 (%2.7) ile hAdV-14 (%1.4) olduğu belirtilmiştir²².

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda da hAdV-8'in en yaygın görülen tip olduğu, olguların %13.5-%87.6'sında gözleendiği^{17-19,21,22}, bununla birlikte hAdV-4'ün %6.8-18 oranında görüldüğü^{17,20-22}, bunu takiben hAdV-37'nin ise %0.6-17.5 oranında gözleendiği^{17,19,21,22} ve Yunanistan'da %72.5 oranı ile en baskın hAdV-17'nin saptandığı⁴ yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. 1953-2013 yılları arasında hAdV'leri etken olduğu dünya genelindeki epidemik keratokonjunktivit, faringokonjunktival ateş ve hemorajik konjunktivit salgınlarının virolojik epidemiyolojik analizinde 76 konjunktivit salgınına ait 83 hekzon geni dizisinin analiz edildiği bildirilmiştir. Salgınların en önemli nedeninin hAdV-8, hAdV-7 ve hAdV-2 ve EV-70 ile ko-enfeksiyon olduğu belirtilmiştir²³.

Ülkemizde yapılan kapsamlı bir çalışmada hAdV'lerin oküler lezyonlarda genotip ve mevsimsel dağılım farklılığının bulunduğu, hastalığın pik yaptığı mevsimin genelde ilkbahar ayları olduğu bildirilmiştir¹⁰. Ancak bizim yaptığımız çalışmada akut konjunktivit ön tanısı ile Aralık ayında başvuran hastalara ait örneklerde daha fazla pozitiflik oranının saptandığı görülmüştür. Diğer yandan Çin Beijing'de yapılan çalışmada adenoviral konjunktiviti olgularda, yıldan yıla sirküle olan tipin değiştiği ve hAdV-37, hAdV-4 ve hAdV-53'ün sırasıyla 2011, 2012 ve 2013 yıllarında predominant olarak görüldüğü gösterilmiştir¹⁷. Epidemik keratokonjunktivit, akut hemorajik konjunktivit ve faringokonjunktival ateşe farklı adenovirüs serotiplerinin neden olduğu ve dünya genelinde farklı sirkülasyon paternlerine sahip olduğu ileri sürülmektedir. Epidemiyolojik bulgular, epidemik keratokonjunktivit ve akut hemorajik konjunktivit olgularının Asya'da kış döneminin başlangıcı ve bahar aylarında genelde sirküle olduğu, buna karşın faringokonjunktival ateşin özellikle Çin, Avustralya ve ABD'de yaz aylarında sirküle olduğu belirtilmektedir²³. Bu sebeple gelecekte konjunktivit salgınlarının izlenmesi için küresel sürveyans sisteminin oluşturulması gündeme gelmiştir. Zira ABD'de genotiplendirmeye yönelik hAdV sürveyansının amacının, hAdV sirkülasyon paterninin izlenmesi, olası salgılar ile ilişkili sirküle olan tiplerin tanımlanması ve doğrulanmasına yardımcı olması ve tanısal test, terapötik ve aşıların geliştirilmesi veya kullanılmasına yönelik bilgi sağlanması olarak belirtilmektedir²⁴.

Adenovirüs enfeksiyon tanısının laboratuvar tarafından doğrulanması, hızla uygun hijyenik önlemlerin alınması ve enfeksiyonun epidemiyolojik öneminin belirlenmesi yönünden klinisyene yardımcı olmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ise yüksek duyarlılık-özgüllüğe sahip olması ve hızla gerçekleştirilmesi nedeni ile tercih edilen bir tanısal yaklaşımdır⁴. Adenoviral oküler enfeksiyonlarının tanısında hızlı, ucuz ve doğru bir yöntemin uygulanması ile toplumda virüsün yayılımının sınırlandırılması ve ayrıca gereksiz

yere pahalı ampirik antibiyotik tedavisinin uygulanmasının engellenmesi açısından son derece önemlidir³. Çalışmanın gerçekleştirildiği laboratuvarımızda konjunktivit klinik olgularında rutin olarak herhangi bir laboratuvar testi uygulanmamaktadır. Ülkemizde de oküler enfeksiyonlarda hAdV'lerin epidemiyolojik ve moleküler olarak incelenmesine yönelik herhangi bir süreyans sistemi bulunmamaktadır. Birçok olgu da muhtemelen kişiden kişiye bulaş şeklinde olmaktadır. Klinik uygulamalarda toplumda en sık görülen tiplerin erken tespiti salgınların önlenmesi ve gereksiz antibiyotik tedavisinin önlenmesi açısından önem arz edebilmektedir. Bu sebeple sık görülen ve epidemiyolojik riski yüksek hAdV tiplerinin tespit ve ayırımı sağlayan moleküler yöntemlerin kullanılması önerilebilir.

hAdV'ler çevre koşullarına dirençlidir ve kontamine yüzeylerde 4-5 hafta enfeksiyöz kalabilmektedirler²⁵. Diğer yandan enfekte vücut sıvıları ile kontamine araçlardan kolaylıkla taşınabileceğini gösteren bir çalışmada, konjunktivit olguları ile temas öyküsünün enfeksiyon riskinin artmasına sebep olduğu gösterilmiştir²⁶. Bu sebeple tedavide temel yaklaşımın hastalığın yayılımının engellenmesi için kişisel hijyene dikkat edilmesi yani iyi el yıkama, kişisel eşya paylaşımının önlenmesi ile enfekte hastaların izolasyonuna dikkat çekilmiştir.

Yaptığımız bu çalışma, Türkiye'de şüpheli akut konjunktivit olgularında gerçekleştirilmiş nadir çalışmalardan biridir. Çalışmada Mersin ilinde enfeksiyöz konjunktivit klinik tanısı konulan hastalarda adenoviral konjunktivitinin prevalansı hekzon geni PCR'ı ile ülkemiz ve dünyanın diğer bölgelerinde bildirilen prevalans oranı ile uyumlu bir şekilde %30 olarak belirlenmiştir. Çalışmada bölgemizde birden fazla hAdV genotipinin akut konjunktivit olguları ile ilişkili olduğu ve predominant olarak sirküle olan genotipin hAdV-8 olduğu belirlenmiş olup, ülkemizde hAdV tiplerinin moleküler epidemiyolojine katkıda bulunacaktır. Çalışmada genotiplerin belirlenmesi için kullanılan direkt DNA dizi analizi, oldukça etkili, doğru ve hızlı bir yöntemdir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Jhanji V, Chan TC, Li EY, Agarwal K, Vajpayee RB. Adenoviral keratoconjunctivitis. *Surv Ophthalmol* 2015;60(5):435-4.
2. Maranhão 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(4):227-9.
3. Pinto RD, Lira RP, Arieta CE, Castro RS, Bonon SH. The prevalence of adenoviral conjunctivitis at the Clinical Hospital of the State University of Campinas, Brazil. *Clinics (Sao Paulo)* 2015;70(11):748-50.
4. Balasopoulou A, Kokkinos P, Pagoulatos D, Plotas P, Makri OE, Georgakopoulos CD, et al. A molecular epidemiological analysis of adenoviruses from excess conjunctivitis cases. *BMC Ophthalmol* 2017;17(1):51.
5. Omari AA, Mian SI. Adenoviral keratitis: a review of the epidemiology, pathophysiology, clinical features, diagnosis, and management. *Curr Opin Ophthalmol* 2018;29(4):365-72.

6. 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(7):1324-7.
7. Garcia-Zalisnak D, Rapuano C, Sheppard JD, Davis AR. Adenovirus ocular infections: prevalence, pathology, pitfalls, and practical pointers. *Eye Contact Lens* 2018;44Suppl 1:S1-S7.
8. Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45(11):3631-40.
9. Yağci R, Akçali A, Yağci S, Konno T, Ishiko H, Duman S, et al. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol* 2010;20(4):669-74.
10. Erdin BN, Pas SD, Durak İ, Schutten M, Sayiner AA. A 5-year study of adenoviruses causing conjunctivitis in Izmir, Turkey. *J Med Virol* 2015;87(3):472-7.
11. Akçay E, Çarhan A, Hondur G, Tufan ZK, Duru N, Kılıç S, et al. Molecular identification of viral agents associated with acute conjunctivitis: a prospective controlled study. *Braz J Infect Dis* 2017;21(4):391-5.
12. Kiraz A. Konjonktivitli hastalarda adenovirüsün çeşitli yöntemlerle araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi*, 2013.
13. Alfonso SA, Fawley JD, Alexa Lu X. Conjunctivitis. *Prim Care* 2015;42(3):325-45.
14. Çiçek C, Sanlıdağ T, Akçali S, Sayan M, Yazal M, Metin DY. Molecular typing of adenoviruses isolated from clinical specimens by PCR and DNA sequencing methods. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(4):607-13.
15. Caldwell GG, Lindsey NJ, Wulff H, Donnelly DD, Bohl FN. Epidemic of adenovirus type 7 acute conjunctivitis in swimmers. *Am J Epidemiol* 1974;99(3):230-4.
16. Ghanaem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, Yatsiv I, Braun J, Dehtyar N, et al. An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(11):948-52.
17. Li J, Lu X, Jiang B, Du Y, Yang Y, Qian H, et al. Adenovirus-associated acute conjunctivitis in Beijing, China, 2011-2013. *BMC Infect Dis* 2018;18(1):135.
18. Maranhão 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(4):227-9.
19. Gopalkrishna V, Ganorkar NN, Patil PR. Identification and molecular characterization of adenovirus types (HAdV-8, HAdV-37, HAdV-4, HAdV-3) in an epidemic of keratoconjunctivitis occurred in Pune, Maharashtra, Western India. *J Med Virol* 2016;88(12):2100-5.
20. Singh MP, Ram J, Kumar A, Rungta T, Gupta A, Khurana J, et al. Molecular epidemiology of circulating human adenovirus types in acute conjunctivitis cases in Chandigarh, North India. *Indian J Med Microbiol* 2018;36(1):113-5.
21. Fedoui N, Ben Ayed N, Ben Yahia A, Hammami W, Matri L, Nacef L, et al. Molecular detection and characterization through analysis of the hexon and fiber genes of adenoviruses causing conjunctivitis in Tunisia, North Africa. *J Med Virol* 2017;89(2):304-12.
22. Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, Akanuma M, Ohguchi T, Ariga T, et al. Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis* 2010;16:2132-6.
23. Zhang L, Zhao N, Sha J, Wang C, Jin X, Amer S, et al. Virology and epidemiology analyses of global adenovirus-associated conjunctivitis outbreaks, 1953-2013. *Epidemiol Infect* 2016;144(8):1661-72.
24. Binder AM, Biggs HM, Haynes AK, Chommanard C, Lu X, Erdman DD, et al. Human adenovirus surveillance-United States, 2003-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017;66(39):1039-42.
25. O'Brien TP, Jeng BH, McDonald M, Raizman MB. Acute conjunctivitis: truth and misconceptions. *Curr Med Res Opin* 2009;25(8):1953-61.
26. Meyer-Rüsenberg B, Loderstädt U, Richard G, Kaulfers PM, Gesser C. Epidemic keratoconjunctivitis: the current situation and recommendations for prevention and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(27):475-80.