

Gastroenterit semptomları olan olgularda adenovirüs sıklığının shell-vial hücre kültürü yöntemi ile saptanması

Detection of adenovirus frequency in cases with gastroenteritis symptoms by shell-vial cell culture

Ayşegül AKSOY-GÖKMEN¹, Candan ÇİÇEK², Hale KALFAOĞLU³, Eylem Ulaş SAZ⁴

ÖZET

Amaç: Virüslere bağlı gastroenteritler tüm dünyada yaygındır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çocuklar için son derece önemli bir sağlık sorunu ve önde gelen bir mortalite sebebidir. Viral patojenler arasında rotavirüs (%25-65) ve enterik adenovirüsler (%5-15) en yaygındır. Bu çalışmada Ocak 2010 - Mart 2014 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarına gastroenterit ön tanısı ile gönderilen hastaların dışkı örnekleri incelendi. Dışkı örneklerinde adenovirüs sıklığının shell-vial hücre kültürü tekniği ile belirlenmesi, yaş ve mevsimlere göre dağılımının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 264 akut gastroenterit ön tanılı hasta retrospektif olarak çalışmaya dahil edildi. Adenovirüs izolasyonunda shell-vial hücre kültürü yöntemi ve HEP-2 hücre dizisi (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya) kullanıldı. İşlemlerin tümü ikinci düzey biyogüvenlik kabinlerinde yapıldı. Her hasta için bir hücre kültürü tüpü hazırlandı. Adenovirüsün saptanmasında, iki günlük inkübasyon süresi sonunda etkene özgül floresan izotiyosyanat ile işaretlenmiş monoklonal antikor (Light Diagnostic,

ABSTRACT

Objective: Gastroenteritis which is caused by viruses are common all over the world. It is a very important health problem and a leading cause of mortality for children in developed and developing countries. Among the viral pathogens, rotavirus (25-65%) and enteric adenovirus (5-15%) are the most common. In this study, stool specimens of patients sent to Ege University Medical Faculty Medical Microbiology Department Virology Laboratory between January 2010 and March 2014 for pre-diagnosis of gastroenteritis were examined. It is aimed to determine the frequency of adenovirus in stool specimens by shell-vial cell culture technique and to investigate its distribution according to age and season.

Methods: A retrospective study of 264 patients with acute gastroenteritis were included in the study. The shell-vial cell culture method and HEP-2 cell line (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Germany) were used for adenovirus isolation. All of the operations were done in second level biosecurity cabinets. A cell culture tube was prepared for each patient. In the detection of adenovirus, monoclonal antibody (Light Diagnostic, Millipore, USA) labeled with effect specific fluorescein isothiocyanate was used at the

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

³Buca Seyfi Demirsoy Devlet Hastanesi, İzmir

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Ayşegül AKSOY-GÖKMEN

İzmir Katip Çelebi Üni. Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Karabağlar 35000 İzmir - Türkiye

Tel : +90 542 357 20 16

E-posta / E-mail : aaksoygokmen@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.01.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 29.07.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.38233

Aksoy-Gökmen A, Çiçek C, Kalfaoğlu H, Saz EU. Gastroenterit semptomları olan olgularda Adenovirüs sıklığının shell-vial hücre kültürü yöntemi ile saptanması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(2): 177-182

Millipore, ABD) kullanıldı. Floresan mikroskopta (Olympus BX50, Japonya) 20X ve 40X büyütmede değerlendirildi. En az iki veya daha fazla sayıda hücrenin tipik elma yeşili floresans verdiği örnekler pozitif olarak kabul edildi.

Bulgular: Akut gastroenterit ön tanısı ile çalışmaya dahil edilen 264 hastanın 190'ı çocuk (%72), 74'ü (%28) erişkindi. Viroloji laboratuvarına gönderilen 264 dışkı örneğinin 13 (%4.9)'ünde shell-vial hücre kültürü tekniği ile adenovirüs pozitifliği bulundu (Şekil 1). Pozitif bulunan örneklerin tümü 18 yaş altı hastalardı. Olguların 111'i kadın (%42), 153'ü erkek (%58) idi. Adenovirüs pozitifliği oranı açısından cinsiyetler arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Mevsimsel sıklık açısından dışkıda shell vial hücre kültürü yöntemiyle adenovirüs pozitifliği en düşük (%0.4) yaz aylarında, en yüksek kış aylarında bulundu.

Sonuç: Bölgemizde gastroenterit vakalarında enterik adenoviral etkenin de rutin olarak araştırılması gerektiğini düşünüyoruz, ayrıca altın standart yöntem olan hücre kültürü ile yapılan çalışmamızdan elde edilen veriler epidemiyolojik verilere katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gastroenterit, adenovirüs, shell-vial hücre kültürü

end of the two-day incubation period. The fluorescence microscope (Olympus BX50, Japan) was evaluated at 20X magnification and 40X magnification. Specimens that gave at least two or more of the cells a typical apple green fluorescence were considered positive.

Results: Of the 264 patients included in the study with acute gastroenteritis pre-diagnosis, 190 (70%) were children (72%) and 74 (28%) were adults. 13 (4.9%) of the 264 stool samples sent to the virology laboratory had adenovirus positivity with the shell-vial cell culture technique. All positive samples were under 18 years of age. Of the cases, 111 were female (42%) and 153 were male (58%). There was no significant difference between genders in terms of adenovirus positive rate ($p>0.05$). In terms of seasonal frequency, adenovirus was found to be the lowest in summer (0.4%) and the highest in winter (by shell vial cell culture in stool).

Conclusion: Although we think that enteric adenoviral agent should be investigated routinely in the gastroenteritis cases in our region, the data obtained from our work done with cell culture, which is the gold standart method, contribute to the epidemiological data.

Key Words: Gastroenteritis, adenovirus, shell-vial cell culture

GİRİŞ

Akut gastroenteritler (AGE), gelişmiş ülkelerde yüksek morbidite, gelişmekte olan ülkelerde ise yüksek mortalite ile ilişkilidir. Tüm dünyada viral etyolojili gastroenteritler yaygın olup, özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çocuklar için son derecede önemli bir sağlık sorunudur(1, 2). Akut gastroenterit etiyojisinde viral patojenler arasında ilk sırada rotavirüs (%25-65) ve enterik adenovirüsler (%5-15) yer almakta ve bunu takiben diğer viral etkenler olan norovirüs ve astrovirüsler bulunmaktadır (2, 3). Dünyada, rotavirüs ve adenovirüse bağlı yılda 150 milyon gastroenteritli vaka olduğu, bunların

800.000'inin ölümlerine sonuçlandığı bildirilmektedir (3). Enterik adenovirüsler en çok iki yaş altında görülmekte olup, çocuk ishallerinin %5-20'siyle ilişkilidir (1, 4). Adenovirüsler çift sarmallı çıplak DNA virüsüdür ve A'dan G'ye kadar yedi alt cins altında toplanan 52 farklı serotip ile insanlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bağırsak enfeksiyonlarına çoğunlukla adenovirüs serotipleri 40 ve 41 (F türü) neden olur (5). Adenovirüse bağlı AGE'ler yılın tüm aylarında sıklıkla görülebilmektedir. Adenovirüs enfeksiyonları, klinik olarak laboratuvar testleri olmadan diğer bakteriyel

ve viral gastroenteritlerinden ayrılamaz. Adenovirüs enfeksiyonu tanısı, virüs izolasyonu, viral antijen ya da viral genomun saptanması gibi direkt yöntemlerle yapılabilmektedir (5-7). Rutinde Adenoviral gAGE tanısında hızlı tanı kitleri (immünokromotografik kasetler) kullanılmaktadır. Bu testlerde, duyarlılık ve özgüllük farklı oranlarda bildirilmektedir. Tanıda altın standart yöntem hücre kültürüdür ancak deneyimli uzman kişilere ve ekipmana ihtiyaç olduğundan, hızlı ve duyarlı olan moleküler yöntemler tanıda daha çok tercih edilmektedir (8).

Bu çalışmada, AGE tanılı hastaların dışkı örneklerinde adenovirüs sıklığının shell-vial hücre kültürü tekniği ile belirlenmesi, yaş ve mevsimlere göre dağılımının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2010-Mart 2014 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Viroloji Laboratuvarına adenovirüs hücre kültürü isteğiyle gönderilen 264 akut gastroenterit ön tanılı hasta retrospektif olarak çalışmaya dahil edildi. Adenovirüs izolasyonunda, shell-vial hücre kültürü yöntemi ve HEp-2 hücre dizisi (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya) kullanıldı. İşlemlerin tümü ikinci düzey güvenlik

kabinlerinde yapıldı. Her hasta için bir hücre kültürü tüpü hazırlandı. Adenovirüsün saptanmasında, iki günlük inkübasyon süresi sonunda etkene özgül floresan izotiyosiyanat ile işaretlenmiş monoklonal antikor (Light Diagnostic, Millipore, ABD) kullanıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Olympus BX50, Japonya) 20X ve 40X büyütmede değerlendirildi. En az iki veya daha fazla sayıda hücrenin tipik elma yeşili floresans verdiği örnekler pozitif olarak kabul edildi.

BULGULAR

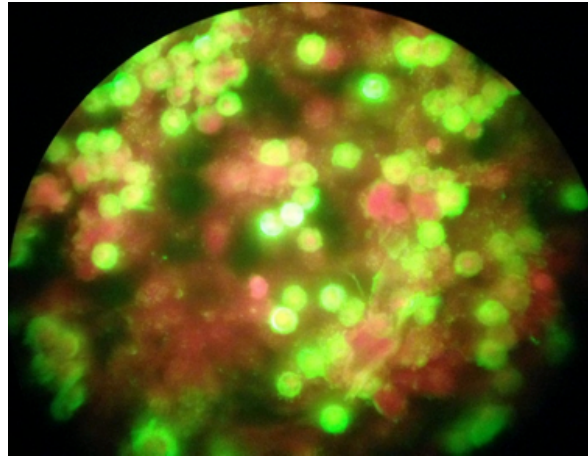
Çalışmaya alınan 264 hastanın 190 (%72)'ı çocuk (0-18 yaş), 74 (%28)'ü erişkindi (18-86 yaş). Hastaların ortanca yaşı 6.5 (0-86) yıldı. Olguların 111'i kadın (%42), 153'ü erkek (%58) hasta idi. Shell-vial hücre kültürü tekniği ile 264 dışkı örneğinin 13 (%4.9)'ünde adenovirüs pozitifliği bulundu (Tablo 1). Adenovirüs pozitifliği saptanan hastaların yedi'si erkek altı'sı kızdı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Adenovirüs shell vial pozitifliği mevsimsel olarak değerlendirildiğinde ise kış mevsiminde 161 hastanın 7'sinde (%2.65), ilkbahar mevsiminde 43 hastanın 2' sinde (%0.75), yaz mevsiminde 22 hastanın 1'inde (%0.4), sonbahar mevsiminde 38 hastanın 3'ünde (%1.1) pozitiflik tespit edildi (Tablo 2). En fazla pozitiflik kış mevsiminde

Tablo 1. Adenovirüs shell vial hücre kültürü yöntemiyle pozitif saptanan hastaların özellikleri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Örneklerin Toplandığı Dönem
1	E	48 ay	Kış
2	K	50 ay	Kış
3	E	72 ay	Kış
4	E	60 ay	Kış
5	K	24 ay	Kış
6	K	44 ay	Kış
7	E	52 ay	Kış
8	K	30 ay	İlkbahar
9	K	18 ay	İlkbahar
10	E	30 ay	Yaz
11	E	52 ay	Sonbahar
12	K	28 ay	Sonbahar
13	E	34 ay	Sonbahar

Tablo 2. Adenovirüs shell vial hücre kültürü istemiyle gönderilen hastaların mevsimsel dağılımı

Mevsim	Pozitif	Negatif	Toplam
Kış	7 (%2.65)	154 (%58.3)	161
İlkbahar	2 (%0.75)	41 (% 15.5)	43
Yaz	1 (% 0.4)	21 (% 8)	22
Sonbahar	3 (%1.1)	35 (% 13.3)	38
Toplam	13 (%4.9)	251 (% 95.1)	264

**Şekil 2.** Shell vial hücre kültürü yönteminde Hep-2 hücresinde adenovirüs pozitifliği görünümü

görülse de adenovirüs shell vial pozitifliği açısından mevsimsel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Enfeksiyöz gastroenteritlerde, hastada malnütrisyon, bağışıklık sistemi sorunları, yeni doğan, prematüre bebeklerde, organ nakli hastalarında, eklem veya kalp kapakçığı protezi olan kişilerde gastroenterit kliniği ağır seyrettiğinden mortalite ve morbiditeyi olumsuz etkilemektedir. Bu nedenlerle bu olgularda hızlı ve güvenilir şekilde laboratuvar tanısının koyulması mortalite ve morbiditeyi azaltarak prognozu olumlu etkilemektedir (8, 9).

Adenovirüs tanısında, sıklıkla dışkıda rotavirüs antijen pozitifliğini de beraberinde gösteren immünokromotografik kaset testler kullanılmaktadır. Dışkı örneklerinde adenovirüs pozitifliği ülkemizde

farklı sıklıkta bildirilmektedir. İmmünokromotografik kaset test yöntemi ile adenovirüs serotip 40 ve 41 insidansını araştıran Isparta merkezli bir çalışmada; 3206 dışkı örneğinin 102 (%3.2)'sinde adenovirüs antijeni saptanmıştır. Pozitif bulunan hastaların %82.3'ü 0-5 yaş arası çocuklar olduğu ve olguların yılın her mevsiminde benzer sıklıkta dağıldığı bildirilmiştir (7). Kocaeli'de yapılan immünokromotografik yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada; 1069 dışkı örneğinin %2.9'unda ($n=31$) adenovirüs saptanmış ve bu enfeksiyonların %52.2'sinin kış aylarında olduğu tespit edilmiştir (9). Konya ilinden bildirilen başka bir çalışmada ise aynı yöntemle 5156 dışkı örneğinin 120 (%2.3)'ünde adenoviral antijenler saptanmıştır (4). Konya'da yapılan yine başka bir çalışmada ise ishali çocuklarda immünokromotografik kaset testi ile adenovirüs pozitifliği %10,4 oranında bulunmuştur (10). Aynı ilden bildirilen bu çalışmalar arasındaki

farklı hasta popülasyonu ve kullanılan kromotografik kaset testin duyarlılık ve özgüllüklerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Farklı yayınlarda adenovirüs enfeksiyon oranları, yurtiçi çalışmalarda %4.4-16.2, yurtdışı çalışmalarda %2.4-22.2 arasında değişmektedir (11). Bu çalışmada shell-vial hücre kültürü tekniği ile örneklerin %4.9'unda pozitiflik saptandı. Bu oran ülkemizde bildirilen birçok çalışma ile benzer olduğu belirlendi.

Dışkıda hücre kültürü tekniği ile adenovirüslerin tespiti özgüllük oranı kaset testlerden daha yüksek olup moleküler testler ile birlikte referans test olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte kaset testler bir saat içerisinde sonuç verirken hücre kültüründe bu süre birkaç günü bulabilmesi hücre kültürünün dezavantajıdır. Adenovirüs enfeksiyonlarının tanısında shell vial yöntemiyle virüs izolasyonu klasik hücre kültüründeki gibi sitopatik etkinin oluşması beklenmediği için daha erken tanı sağlamakta, ayrıca floresan-ışaretili monoklonal antikorların kullanılması virüsün tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak klasik hücre kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılığının daha düşük (%90'a karşı %83) olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte inkübasyon süresi iki günden beş güne uzatıldığında duyarlılığın arttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (6, 12).

Adenoviral AGE sıklığı oranları ile ilgili olarak ülkemizin çeşitli illerinden bildirilen bu farklı oranların en önemli nedeni enfeksiyonun mevsimsel olarak değişiklik göstermesi, kullanılan yöntemin duyarlılığı ve araştırma yapılan bölgenin sosyoekonomik ve kültürel özelliklerine bağlı olabilir. Bununla birlikte ülkemizde adenovirüs epidemiyolojisinin tespitinde hücre kültürünün kullanıldığı araştırmalar azdır.

Adenovirüs enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu iki

yaşın altındaki çocuklarda meydana gelir (8). Yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, dört yaşın altındaki çocukların çoğunluğunun bir kez bu enfeksiyonu geçirdiğini göstermektedir (13). Tuncer ve ark.'nın (8) adenovirüslere bağlı gastroenteritli hastalarla ilgili yaptığı bir çalışmada, en küçüğü 26 günlük en büyüğü dört yaşında olmak üzere olguların %90'ının iki yaş altında olduğunu saptanmıştır. Bu çalışmada; pozitiflik saptanan en büyük olgu 72 ay, en küçüğü ise 18 aylıktı. Yapılan çalışmalarda, genel olarak adenoviral AGE sıklığında cinsiyet açısından bir fark olmadığı bildirilmektedir (7, 8, 10). Jarecki-Khan ve ark. (14) erkek çocuklarda adenovirüs 40 ve 41 enfeksiyonunu kız çocuklardan iki kat daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu çalışmada da her iki cinsiyet arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Adenovirüs yönünden pozitif olgular ise çalışmalarla uyumlu olarak tüm yıl boyunca görülmüştür (8, 15). Kandemir ve ark.'larının (16) yaptığı çalışmada, en yüksek pozitiflik %8 ile ilkbahar mevsiminde görülürken, ülkemizden farklı iki çalışmada ise en yüksek pozitiflik oranı yaz mevsiminde görülmüştür (17, 18). Kanada'da yapılan çalışmada ise mevsimsel olarak farklılık görülmediği bildirilmiştir (19). Japonya'da on yılı aşkın bir sürede yapılan çalışmada en sık kış aylarında adenovirüs pozitifliği görülmüştür (20). Bu çalışmada, adenovirüs pozitifliği en çok kış mevsiminde görülse de adenovirüs pozitifliği açısından mevsimsel olarak anlamlı fark görülmedi.

Sonuç olarak gastroenterit vakalarında enterik adenoviral etkenin de rutin olarak araştırılması gerektiğini düşündürmekle birlikte altın standart yöntem olan hücre kültürü ile yapılan çalışmamızdan elde edilen veriler epidemiyolojik verilere katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Çaycı YT, Yılmaz G, Birinci A. Akut gastroenterit vakalarında rotavirüs ve adenovirüs sıklığının araştırılması. Pamukkale Tıp Derg, 2017;10 (1) : 61-65.
2. Özer T, Yula E, Devenci Ö, Tekin A, Durmaz S, Gülenç M, et al. Frequency of rotavirus and enteric adenoviruses among children with acute gastroenteritis in a district hospital. J Microbiol Infect Dis 2015; 1: 64-67.
3. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, et al. Assessment of gastroenteric virüs frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). PLOS One, 2012; 7 (3) :e33754.
4. Tüzüner U, Gulcen BS, Ozdemir M, Feyzioğlu B. Gastroenteritli çocukların dışkılarında adenovirüs ve rotavirüs sıklığı ve mevsimsel dağılımı. Klimik ,2016; 29 (3): 121-4.
5. Kim J, Kim HS, Kim JS, Song W, Lee KM, Lee S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of rotavirüs and adenovirus in stool samples. Ann Lab Med, 2014; 34(3): 216-222.
6. Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, Ghafouriana S. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. Osong Public Health Res Perspect, 2016; 7 (2): 77-82.
7. Akpınar Ö, Akpınar H. Investigation of the enteric adenovirus antigen frequency by immunochromatographic method in children with acute gastroenteritis. Meandros Med Dent J ,2017;18: 86-9.
8. Tuncer S, Ceyhan M, Yurdakök K, Kanra G, Ustaçelebi S. İnsan adenovirüslerinin restriksiyon endonükleaz analizi ile tiplendirilmesi ve çocuk gastroenteritlerinde enterik adenovirus sıklığının belirlenmesi. Flora, 1997; 3:195-207.
9. Yazıcı V, Manzur Y, Aynur Akbulut. Akut gastroenteritli olgularda rotavirüs ve enterik adenovirüs infeksiyonlarının sıklığının araştırılması. Klimik, 2013; 26 (1): 13-6.
10. Çelik AY, Emiroğlu M, Kurtoğlu MG, İnci A, Odabaş D. Akut gastroenteritli 0-5 yaş arası çocuklarda viral etkenlerin sıklığının araştırılması. Türkiye Çocuk Hast Derg, 2016; 2: 101-6.
11. İnan N, Kabakoğlu Ünsür E, Demirel A, Mamçu D, Sönmez E, Arısoy A. Akut viral gastroenterit ön tanıli vakalarda rotavirüs, adenovirüs ve nörovirüs sıklığının araştırılması. Ankem, 2014; 28 (1): 14-9.
12. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, Güney SV, Özkul A, Öğünç D, Çolak D. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda adenovirüslerin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2013; 47 (2): 282-294.
13. Foy HM. Adenoviruses In: Evans AS, (ed). Viral Enfections of Humans. . Plenum Pub Corp, 3rd ed. 1989;77-94.
14. Jarecki-Khan K, Tzipori SR, Unicomb LE. Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. J Clin Microbiol, 1993; 31 (3) :484-9.
15. Çelik AY, Emiroğlu M, Kurtoğlu MG, İnci A, Odabaş D. Akut gastroenteritli 0-5 yaş arası çocuklarda viral etkenlerin sıklığının araştırılması. Türkiye Çocuk Hast Derg, 2016; 2: 101-6.
16. Kandemir İ, Atalay MA, Delice S, Taş SK, Gökahmetoğlu S. Gastroenteritli çocuklarda enterik adenovirüs antijenleri. Turk J Immunol, 2014; 2 (1): 1-4.
17. Biçer S, Şahin G.T, Koncay B, Gemici H, Engerek N, Ulucaklı Ö, Özlü N, Şiraneci R. Çocuklarda Adenovirüs Gastroenteriti Olgularının Sıklığı. Bakırköy Tıp Dergisi Araştırmalar, 2009; 5: 6-10.
18. Gültepe B, Yaman G, Çıkman A, Güdücüoğlu H. Çocukluk yaş grubu gastroenteritlerde rotavirüs ve adenovirüs sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 1012; 42: 16-20.
19. Dey SK, Hoq I, Okitsu S. Prevalance, seasonality and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. Epidemiol Infect, 2013; 141: 958-60.
20. Pang XL, Preiksatis JK, Lee BE. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real time PCR panel: A one-year study. J Med Virol, 2013; 1594-1601.