

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**İNFEKTOBEZİTE: ADENOVİRÜSLERİN ÇOCUKLARDA
OBEZİTEDEKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Elçin KAL ÇAKMAKLIOĞULLARI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr.Tamer ŞANLIDAĞ

MANİSA, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

KISALTMALAR

TABLO LİSTESİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Obezitenin tanım	3
2.2. Çocukluk çağı obezite prevalansı	3
2.3. Obezite sınıflaması	4
2.3.1. Yağ dokusunun dağılımı ve anatomik özelliklerine göre	4
2.3.1.1. Hipersellüler obezite	4
2.3.1.2. Hipertrofik obezite	5
2.3.1.3. Yağ dağılımına göre obezite	5
2.3.2. Obezitenin başlama yaşına göre	5
2.3.3. Etiyolojiye göre	5
2.3.3.1. Basit obezite (Ekzojen obezite)	5
2.3.3.2. Sekonder obezite (Endojen obezite)	5
2.3.3.2.1. Sekonder obezite nedenleri	6
2.4. Obezite ölçüm yöntemleri	7
2.5. İnfektobezite kavramı	7
2.5.1. Canine Distemper Virus	8
2.5.2. Rous-associated Virus-7	9

2.5.3. Borna Disease Virus	9
2.5.4. Scrapie Ajanı	10
2.5.5. SMAM-1	10
2.5.6. Adenovirüsler	11
2.5.6.1. Adenovirüslerin sınıflaması	12
2.5.6.2. Adenovirüslerin yapısal özellikleri	13
2.5.6.3. Adenovirüslerin üreme özellikleri	14
2.5.6.4. Adenovirüslerin laboratuvar tanısı	15
2.5.6.4.1. Mikroskopi	15
2.5.6.4.2. Antijen tanımlaması	15
2.5.6.4.3. Nükleik asit saptama teknikleri	17
2.5.6.4.4. İzolasyon yöntemleri	18
2.5.6.4.5. Tiplendirme sistemleri	19
2.5.6.4.6. Serolojik testler	20
2.5.6.5. Adenovirüslerin epidemiyolojisi	21
2.5.6.6. Adenovirüslerin oluşturduğu hastalıklar	22
2.5.6.6.1. Solunum yolu infeksiyonları	22
2.5.6.6.2. Göz infeksiyonları	23
2.5.6.6.3. Gastrointestinal sistem hastalıkları	23
2.5.6.6.4. Diğer hastalıklar	24
2.5.6.7. Obezite ile ilişkili adenovirüsler	25
2.5.6.7.1. Ad-36	25
2.5.6.7.2. Ad-37	28
2.5.6.7.3. Ad-5	29
2.5.6.8. Viral obezitenin mekanizmaları	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Adenovirüslerin tiplendirilmesi	32
3.1.1. Viral DNA izolasyonu	33
3.1.1.1. Göz, solunum yolu ve çevresel örneklerden nükleik asit izolasyon protokolü	33

3.1.1.2. Kan ve vücut sıvılarından nükleik asit izolasyon protokolü	34
3.1.2. PZR	35
3.1.2.1. Agaroze jelde yürütme ve görüntüleme	36
3.1.2.2. PZR sonrası saflaştırma işlemi	36
3.1.3. Dizileme reaksiyonu	37
3.1.4. Filogenetik analiz	38
 3.2. Çalışma grubu	 39
3.2.1. Adenovirüs spesifik antikor IgA, IgM, IgG	39
3.2.2. Biyokimyasal testler	39
3.2.3. Leptin düzeyi	39
3.2.4. Serum nötralizasyon testi	40
3.2.4.1. Virüslerin üretilip stoklanması	40
3.2.4.2. Doku Kültürü İnfektif Doz (DKID)	40
3.2.4.3. Hep-2 hücrelerinin hazırlanması	41
3.2.4.4. Serum örnekleri	41
3.2.4.5. Mikro-nötralizasyon testi	42
 3.3. İstatiksel analiz	 42
 4. BULGULAR	 43
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR	57

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin tüm aşamalarında değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her konuda destek ve yol gösterici olan, tezim için büyük emek harcayan tez danışmanım değerli hocam Prof.Dr.Tamer ŞANLIDAĞ'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, mesleki gelişimimde büyük katkıları olan, her zaman destek ve hoşgörüsünü gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU'na,

Tezimin tüm aşamalarıda desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım Doç.Dr.Sinem AKÇALI ve Doç.Dr.Candan ÇİÇEK'e,

Tezimde emekleri geçen Prof.Dr.Seda VATANSEVER, Uzm.Dr.Elgin TÜRKÖZ ULUER ve Müjde KIVANÇ'a

Tezimin çalışma grubunu oluşturmamda yardımcı olan Prof.Dr.Betül ERSOY'a ve Dr.Bayram ÖZHAN'a, biyokimyasal çalışmalarımda yol gösteren Prof.Dr.Ahmet VAR'a ve istatistiksel çalışmalarımda yardımcı olan Doç.Dr.Pınar Erbay DüNDAR'a

Uzmanlık eğitimim süresince büyük emekleri olan Prof.Dr.Beril ÖZBAKKALOĞLU, Doç.Dr.Kenan DEĞERLİ, Doç.Dr.Semra KURUTEPE Doç.Dr. Nuri ÖZKÜTÜK,Doç.Dr.Hörü GAZİ ve Yard.Doç.Dr. Talat ECEMİŞ'e ,

Tezimde büyük emekleri olan Olcay TÜREGÖKSU, Gülperi KARAHAN, Bülent DOĞA, Erkan ATSEN, Oğuzhan İŞLEK, İrfan BAYRAM, Nilsu SEVİM ve Nur TARHAN'a

İhtisas süresi boyunca sevgi,saygı ve anlayışı paylaştığım asistan arkadaşlarıma, laborant arkadaşlarıma ve isimlerini sayamadığım tüm üniversite çalışanlarına,

Sonsuz sevgisiyle her zaman güç veren, saygı ve anlayışla hayatımın her aşamasında destek olan ve yol gösteren sevgili eşim Dr.Murat ÇAKMAKLIOĞULLARI'na, yaşam enerjim hayatımın anlamı canım kızım Ece'ye, bugünlere gelmemi sağlayan sonsuz sevgileriyle her zaman yanımda olan babam Hüseyin KAL, annem Neşe KAL ve ablam Ebru TUNCAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Elçin KAL ÇAKMAKLIOĞULLARI

ÖZET

İnfektobezite: Adenovirüslerin Çocuklarda Obezitedeki Rolü

Amaç: Son 20 yıl içerisinde obezitenin yetişkinlerde 2 kat çocuklarda ise 3 kat arttığı ve tüm dünyada epidemiye benzer bir yayılım gösterdiği gözlenmiştir. Epidemiyi açıklamada sadece diyet ve yaşam şeklindeki davranış değişiklikleri yeterli olmayıp epideminin infeksiyöz nedenlerle özellikle de virüslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bazı adenovirüs serotiplerinin [Adenovirüs serotip 36 (Ad-36)] insan obezitesiyle, bazılarının ise (Ad-5 ve Ad-37) hayvan obezitesiyle ilişkili olduğu bildirilirken diğer adenovirüs serotiplerin obeziteyle ilişkileri saptanamamıştır. Bu çalışmada, çeşitli merkezlerden sağlanan klinik örneklerden farklı adenovirüs serotiplerinin elde edilmesi, daha sonra bu serotipler kullanılarak adenovirüslerin çocuk obezitesindeki rollerinin ortaya konması, ayrıca serum lipit ve leptin düzeyleriyle ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Çalışma iki aşamalı olacak şekilde tasarlandı. Birinci aşamada hem toplumda dolaşan adenovirüs serotiplerini belirlemek, hem de çalışmanın ikinci aşamasında uygulanacak mikro-nötralizasyon testinde kullanmak amacıyla Celal Bayar Üniversitesi'nden (solunum-kan, n=88), Kocaeli Üniversitesi'nden (göz-çevresel, n=94) ve Ege Üniversitesi'nden (göz-solunum, n=18) sağlanan klinik örneklerde adenovirüs pozitifliği PZR yöntemiyle, tiplendirme ise sekans analizi ile araştırıldı. Örneklerden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, Lu ve Erdman'ın tanımladığı Adhex F1 ve Adhex R1 primerleri ile amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforezinde pozitif saptanan örnekler pürifiye edildi. Negatif örneklerle nested PCR uygulandı. ABI 310 cihazında dizileme yapılarak blast analizi ile tiplendirildi. Solunum örneklerinde saptadığımız Ad-5, göz sürüntü örneklerinde saptadığımız Ad-8 ve LGC Standards'tan temin ettiğimiz Ad-36

(ATCC VR-1610) serotipleri mikro-nötralizasyon testinde kullanılmak amacıyla hücre kültüründe üretilerek ikinci aşamada kullanılmak üzere -80°C'de stoklandı. Araştırmanın ikinci aşamasında ise Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Endokrin Polikliniği'nden obez (n=60) ve obez olmayan (n=60) 120 çocuktan, 10'ar ml kan örneği alındı. Bu örneklerde adenovirüs spesifik IgG, IgA, IgM antikorları (Radim, İtalya) ve leptin düzeyi (Invitrogen, ABD) mikroEIA; HDL, LDL, trigliserid ve kolesterol düzeyleri (Beckman Coulter,İrlanda) kemilümünesan; Ad-5, Ad-8, Ad-36 serotip spesifik antikorları mikro-nötralizasyon yöntemiyle araştırıldı. Verilerin analizinde t testi ve ki kare testi kullanıldı. $p \leq 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlendi.

Bulgular: Üç ayrı merkezden sağlanan 200 klinik örneğin 84'ünde adenovirüs pozitif, 116'sında negatif bulundu. pozitif örneklerin 11'i tiplendirilemezken, 60'ı serotip 8 (56 göz örneği, 2 çevresel örnek, 2 solunum örneği), 7'si serotip 3 (solunum örneği), 4'ü serotip 4 (3 göz, 1 solunum örneği) ve 2'si serotip 5 (1 göz, 1 solunum örneği) olarak belirlenmiştir. Obez grubun adenovirüs IgM, IgG ve IgA pozitiflikleri sırasıyla %3.3, %100 ve %3.3; obez olmayan grubun %8.3, %93.3 ve %5.0 idi. Obez grupta adenovirüs IgG pozitifliği obez olmayan gruba göre yüksekti ($p \leq 0.05$). Obez grubun HDL, LDL, kolesterol, trigliserid ve leptin düzeyi ortalama $\pm$ SS'leri sırasıyla 44.6 ± 10.2 , 93.2 ± 28.6 , 159.5 ± 34.7 , 107.1 ± 58.8 , 373.5 ± 262.3 iken, obez olmayan grupta 52.3 ± 12.9 , 84.8 ± 23.9 , 155.7 ± 25.3 , 96.8 ± 42.0 , 206.1 ± 176.1 bulundu. Obez gruptaki HDL düzeyi obez olmayan gruba göre düşük, leptin düzeyi ise yüksekti ($p \leq 0.05$). Obez grupta Ad-36 ve Ad-5 nötralizan antikor pozitiflik oranları, obez olmayan gruba göre anlamlı bulunurken ($p \leq 0.05$); Ad-8 nötralizan antikor pozitifliği açısından iki grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p \geq 0.05$).

Sonuç: Ülkemizde adenovirüslerle ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır ve obezite ile ilişkilerini araştıran herhangi bir çalışma günümüze kadar yapılmamıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda Ad-5 ve Ad-36 serotiplerinin çocuklardaki obeziteyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Araştırmamız; Ad-36'nın insan obezitesiyle ilişkisine işaret eden ülkemizdeki ilk çalışma özelliğini

taşıırken, Ad-5'in insan obezitesiyle ilişkisine işaret eden dünyadaki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bu nedenlerle araştırmamız sonuçlarının ülkemiz ve dünya literatürüne önemli katkılarının olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Çocuk, obezite, infeksiyon, adenovirüsler.

ABSTRACT

Infectobesity: The Role of Adenoviruses in Children Obesity

Aim: Over the last 20 years, obesity was observed to increase 2-fold in adults and 3-fold in children, and spread all over the world like an epidemic. Diet and lifestyle-related behaviour changes are not sufficient to explain obesity epidemic, while infectious factors, particularly viruses should be considered, as well. It was reported that, some adenovirus serotypes [Adenovirus serotype 36 (Ad-36)] have been correlated with human obesity, while others (Ad-5 and Ad-37) with animal obesity, but other adenovirus serotypes displayed no correlation with obesity at all. In this present study, it was aimed to identify different adenovirus serotypes from clinical specimens collected from various centers, and by using these isolates, to demonstrate the role of adenoviruses in child obesity, also to investigate their correlation with serum lipid and leptin levels.

Materials and Methods: The study was designed in two-steps. In the first stage of the trial, to determine adenovirus serotypes circulating in the community, also to identify adenoviruses to be further used in the micro-neutralization tests in the second stage of the study, adenovirus positive clinical specimens collected from Celal Bayar University (respiratory-blood, n=88), Kocaeli University (ophthalmic-environmental, n=94), and Ege University (ophthalmic-respiratory, n=18) were investigated by PCR method, and subsequently serotyping was performed by sequence analysis. Following DNA extraction from clinical specimens, amplification was carried out using the Adhex F1 and Adhex R1 primers described by Lu and Erdman. Clinical samples found positive by agarose gel electrophoresis were purified. Negative samples were tested by nested PCR. Sequences were determined using an ABI 310 sequence analyser and typed by BLAST analysis. Ad-5 and

Ad-8 serotypes isolated from respiratory and eye swab samples, respectively, and Ad-36 (ATCC VR-1610) serotype obtained from LGC Standards were produced in cell cultures and stored at -80°C to be further used in the micro-neutralization tests. In the second stage of the trial, 10 ml blood samples were collected from totally 120 children, obese ($n = 60$) and nonobese ($n = 60$), who have admitted to Outpatient Clinic of Department of Pediatric Endocrine of Celal Bayar University. In these blood specimens, Adenovirus-specific IgG, IgA, IgM antibodies (Radim, Italy), and leptin levels (Invitrogen, USA) were tested by microEIA; HDL, LDL, triglyceride and cholesterol levels (Beckman Coulter, Ireland) by chemiluminescence; Ad-5, Ad-8, Ad-36 serotype-specific antibodies by micro-neutralization methods. T test and chi-square test were used in data analysis $p \leq 0.05$ level was recognised as the level of significance.

Results: Of the 200 clinical specimens obtained from three different centers, 84 were determined as adenovirus-positive, while 116 specimens were adenovirus-negative. 11 of the positive samples could not be typed by no means, while 60 samples (56 ophthalmic, 2 environmental, 2 respiratory) were identified as serotype 8, 7 samples (respiratory) as serotype 3, 4 samples (3 ophthalmic, 1 respiratory) as serotype 4, and 2 samples (1 ophthalmic, 1 respiratory) as serotype 5.

In obese group, rates of adenovirus IgM, IgG and IgA positive samples were respectively, 3.3%, 100% and 3.3%; however, in non-obese group, 8.3%, 93.3% and 5.0%, respectively. The rate of IgG positivity was found higher in obese group compared to non-obese group ($p \leq 0.05$). HDL, LDL, cholesterol, triglyceride and leptin levels and mean $\pm$ SD values of obese subjects were found respectively as 44.6 ± 10.2 , 93.2 ± 28.6 , 159.5 ± 34.7 , 107.1 ± 58.8 , 373.5 ± 262.3 , while as 52.3 ± 12.9 , 84.8 ± 23.9 , 155.7 ± 25.3 , 96.8 ± 42.0 , 206.1 ± 176.1 for non-obese subjects. In comparison to non-obese group, HDL values of the obese group were noted lower and leptin levels were found higher ($p \leq 0.05$). In the obese group, the rates of Ad-36 and Ad-5 neutralizing antibody-positive subjects were found statistically significant compared to non-obese group ($p \leq 0.05$); regarding the rate of Ad-8 neutralizing antibody-positivity, no significant correlation was observed between the two groups

($p \geq 0.05$).

Conclusion: In our country, Adenovirus-related research studies are very limited, and furthermore, any study evaluating the relationship between Adenoviruses and obesity has not been conducted yet. According to our study data, Ad-5 and Ad-36 serotypes of Adenoviruses were determined to be associated with obesity in children. Our research is the first national study demonstrating the correlation between Ad-36 serotype and human obesity while the first international study pointing out the correlation between Ad-5 serotype and human obesity. Based on these reasons, we believe the data we achieved in this present study may have important contribution to both national and international literature.

Keywords: Children, obesity, infection, adenoviruses.

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ad-3	Adenovirüs serotip 3
Ad-4	Adenovirüs serotip 4
Ad-5	Adenovirüs serotip 5
Ad-8	Adenovirüs serotip 8
Ad-9	Adenovirüs serotip 9
Ad-11	Adenovirüs serotip 11
Ad-35	Adenovirüs serotip 35
Ad-36	Adenovirüs serotip 36
Ad-40	Adenovirüs serotip 40
Ad-41	Adenovirüs serotip 41
Ad-42	Adenovirüs serotip 42
ARD	Akut Solunum Yolu Hastalığı
AVL	Avian Lökozis Virüs
A549	İnsan Akciğer Karsinom Hücresi
BDV	Borna Disease virüs
CDC	Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi
CDV	Canine Distemper Virüs

CIE	Contur Immün Elektroforez
CRP	C-reaktif protein
DKID	Doku Kültürü İnfektif Doz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EIA	Enzim Immün Assay
EKC	Epidemik Keratokonjunktivit
EM	Elektron Mikroskopi
G	Guanin
HA	Hemaglutinasyon
HAI	Hemaglutinasyon İnhibisyon
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HELA	İnsan Serviks Kanseri Hücresi
Hep-2	İnsan Larinks Epidermoid Kanseri Hücresi
İK	İmmürokromatografi
IEM	İmmün Elektron Mikroskopi
IF	İmmünflorasan
IFN	İnterferon
Ig A	İmmünglobulin A
IL-6	İnterlökin 6
KF	Kompleman Fiksasyon
KİT	Kemik İliği Transplantasyonu
LA	Lateks Aglutinasyon

LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
M Abs	Monoklonal Antikor
MEM	Minimum Esantial Medium
NHANES	Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları (National Health and Nutritio Examination Surveys)
NSE	Nakledilebilir Spongiform Ensefalopati
PrPc	Prion Proteini
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAV-7	Rous Associated Virüs-7
RIA	Radio Immün Assay
S	Sitozin
SN	Serum Nötralizasyon
SPE	Sitopatik Etki
SPSS	Statistical Package For Social Sciences
SK	Santrifügasyon Kültürü
SSS	Santral Sinir Sistemi
TNF- α	Tümör Nekrozitan Faktör Alfa
TG	Trigliserid
Th-1	T helper 1
Vero	Maymun Böbrek Hücresi
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Obeziteye sebep olan hayvan ve insan virüsleri

Tablo-2: Adenoviridae ailesinin cins, tür ve konakları

Tablo-3: İnsanları infekte eden tür ve serotipler

Tablo-4: Adenovirüs serotip dağılımı

Tablo-5: Çalışma grubunun demografik özellikleri

Tablo-6: Çalışma grubunun Ad-5, Ad-8, Ad-36 antikor pozitifliği

Tablo-7: Çalışma grubunun adenovirüs IgA, IgM, IgG pozitifliği

Tablo-8: Çalışma grubunun HDL, LDL, TG, kolesterol ve leptin düzeyi

FİGÜR LİSTESİ

Figür-1: Adenovirüs serotiplerinin filogenetik ağacı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yoğun kentsel yaşam, beslenme alışkanlıklarının değişimi ve diğer birçok nedenlerle insan sağlığını etkileyen güncel sorunlar arasında obezitenin yeri her geçen gün biraz daha artmaktadır. Bazı toplumlarda rapor edilen obezite nedeniyle ölüm oranları ürkütücü boyutlara ulaşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'inde Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları [National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)]'na göre 1976–1980 ve 1999–2002 yılları arasında obez insanların sayısı yaklaşık iki katına çıkmış ve bu yükseliş ivmesi son yıllarda daha da artmıştır. Obezite sadece ABD'de değil, aynı zamanda Avrupa'da da önemli bir sorun haline gelmiştir (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1998 yılında obeziteyi global bir epidemi olarak nitelemiş ve bir halk sağlığı sorunu olduğunu vurgulamıştır (2).

Günümüzde dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde obezite prevalansı artmakta, bu durum sadece yetişkin kadın ve erkekleri değil, çocukları ve gençleri de etkilemektedir. Kalp ve damar hastalıkları, diyabet, hipertansiyon, bazı kanser türleri, kas iskelet sistemi hastalıkları gibi hastalıkların oluşmasına, yaşam kalitesinin azalmasına ve ölümlere yol açan obezite, sadece küresel boyutta bir halk sağlığı problemi olmakla kalmayıp, ülke ekonomilerine olumsuz yönde etki eden bir unsur olarak da karşımıza çıkmaktadır (3).

Obezite, çocuk ve adolesanların %25-30'unu etkileyen önemli bir beslenme problemidir. Çocukluk çağı obezitesi özellikle gelişmiş ülkelerde olmakla beraber bütün dünyada artan bir prevalansa sahiptir. Obeziteye bağlı problemlerin yanı sıra çocukluk çağında obez olanlarda erişkin dönemde morbidite ve mortalitenin artması, adolesan döneme obez girenlerin %50'sinin erişkin dönemde obez olması ve çoğu kez aileler ve hekimler

tarafından tedavi edilmesi gereken bir hastalık olarak görülmemesi açısından önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Obeziteye neden olduğu düşünülen en önemli faktörler olarak genetik, çevresel, nöronal ve endokrin faktörler gösterilmektedir. Ancak sorunun bulaşıcı hastalıklara benzer şekilde hızlı bir yayılma göstermesi obezitenin etiyolojisinde patojen etkenlerin rol alıp almadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Obezite olgularında virüslerin rol alabileceğine ilişkin ilk somut veriler 1978 yılında elde edilmiştir. Günümüze dek üç tanesi insan virüsü (Adenovirüs tip 5 (Ad-5), Ad-36, Ad-37) ve beş tanesi hayvan virüsü (köpek gençlik hastalığı virüsü, Rous-associated virüs tip 7, SMAM-1, Scrapie ajanı, Borna hastalığı virüsü) olmak üzere toplam sekiz virüsün obeziteye neden olabileceği ortaya konulmuştur (1).

Bu çalışmada, üç ayrı merkezden sağlanan 200 klinik örnekte adenovirüs serotip dağılımının saptaması, elde edilen serotiplerin bazılarını kullanarak adenovirüslerin çocuk obezitesindeki rollerinin ortaya konması, ayrıca serum lipit ve leptin düzeyleriyle ilişkilerinin araştırması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezitenin Tanımı

Latince de obezite “obeziteus” sözcüğünden türemiş olup, “yemekten dolayı” anlamındadır. İngilizcede ise obezite, fazla yüklenme anlamına gelmektedir. Obezite vücutta aşırı yağ depolanması ile ortaya çıkan, fiziksel ve ruhsal sorunlara neden olabilen bir enerji metabolizması bozukluğudur. Kalori alımı ile kullanımı arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan multifaktöriyel bir durumdur (5). DSÖ obeziteyi, vücut kompozisyonunda insan sağlığını olumsuz şekilde etkileyecek düzeyde yağ miktarının artışı olarak tanımlamıştır (2).

2.2. Çocukluk Çağı Obezite Prevalansı

Dünya genelinde obezite görülme sıklığını (prevalans) etkileyen etmenler arasında kalıtım, yaş, cinsiyet, besin tüketimi, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı ve alışkanlıkları yer almaktadır (6). Çocukluk çağı obezitesi özellikle gelişmiş ülkelerde olmakla beraber bütün dünyada artan bir prevalansa sahiptir (7). Obeziteyi etkileyen demografik, sosyokültürel ve biyolojik faktörlerin etkisi ile dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde yaşayan çocuklardaki obezite sıklığı arasında büyük değişiklikler görülmektedir. Obezite gelişimi, gelişmiş ülkelerde alt sosyal tabakalarda kötü beslenme alışkanlığı ve az fiziksel aktivite nedeniyle daha sık görülmekte iken, gelişmekte olan ülkelerde ise düşük fiyata daha lezzetli yiyeceklerin bulunduğu batı tarzı beslenme nedeniyle daha çok orta ve üst sosyal tabakalarda görülmektedir (8).

Obezitenin en sık görüldüğü ABD'de Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından yürütülen ABD'nin NHANES çalışmasına göre, 2003-2006 yıllarında 2-19 yaş arası çocuklar ve adolesanların %16.9'unun obez olduğu bildirilmiştir (9).

Avrupa'da okul çağı çocuklarında fazla kilolu olma prevalansı en yüksek olan ülkeler İspanya (6-9 yaş, %35) ve Portekiz (7-9 yaş, %32) olarak bulunmuştur (10).

Ülkemizde çocuk ve adolesanlarda obezite prevalansını yansıtan ulusal düzeyde herhangi bir çalışma olmamakla beraber bölgesel çalışmalar mevcuttur. Kayseri'de 6-10 yaş grubunda 1032, 11-17 yaş grubunda 2671 olmak üzere toplam 3703 çocukta yürütülen bir çalışmada çocukların %10.6'sının fazla kilolu, %1.6'sının obez olduğu belirtilmiştir (11). İstanbul, Ankara ve İzmir'de 12-13 yaşında 1044 adolesan üzerinde yapılan bir çalışmada çocukların %12'si fazla kilolu, %2'si obez olarak saptanmıştır (12). Muğla'da 6-15 yaş arasındaki 4260 çocuk obezite açısından değerlendirilmiş ve kızların %7.6'sının, erkeklerin %9.1'inin obez olduğu bulunmuştur (13). Manisa bölgesinde yapılan 14-18 yaş arası 680 çocuğun beslenme durumlarının vücut antropometrik ölçülerle değerlendirildiği çalışmada obezite oranı %16.8 olarak saptanmıştır (14).

2.3. Obezite Sınıflaması

Obezite yağ dokusunun dağılımı ve anatomik özelliklerine, obezitenin başlama yaşına ve etyolojide rol oynayan faktörlere göre birkaç farklı şekilde sınıflandırılabilir.

2.3.1. Yağ Dokusunun Dağılımı ve Anatomik Özelliklerine Göre

2.3.1.1. Hipersellüler Obezite

Yağ hücre sayısının artışı ile karakterizedir. Çocukluk çağında görülen obezite tipidir. Nadiren erişkin dönemde de ortaya çıkabilir (15).

2.3.1.2. Hipertrofik Obezite

Yağ hücrelerinin büyüklüğü ve lipit içeriğindeki artış ile karakterizedir. Yağ hücre sayısı normaldir. Erişkin dönemde ve gebelikte görülen obezitedir (15).

2.3.1.3. Yağ Dağılımına Göre Obezite

-Android tip obezite (abdominal/santral): Yağ dokusu, karın ve göğüste birikmiştir.

-Gynoid tip obezite (gluteal/periferal): Yağ dokusu, kalça ve uylukta toplanmıştır.

2.3.2. Obezitenin Başlama Yaşına Göre

- Çocukluk yaş grubunda başlayan obezite
- Erişkin dönemde başlayan obezite

2.3.3. Etiyolojiye Göre

2.3.3.1. Basit Obezite (Ekzojen Obezite)

Obez çocukların büyük bir kısmında altta yatan tıbbi bir problem yoktur ve bu grup basit obezite veya primer obezite olarak adlandırılır. Bu gruptaki çocukların çoğunda klinik bir belirti yoktur (15).

2.3.3.2. Sekonder Obezite (Endojen Obezite)

Obezite tanısı konan hastada altta yatan önemli endokrin veya endokrin dışı neden olup olmadığı dikkatle incelenmeli ve patolojik durumlar ekarte edilmelidir. Endokrin, genetik veya diğer nedenler etyopatogeneizde rol aldığı sekonder obeziteden söz edilmektedir. Çocukluk çağı obezitesine neden olan sekonder nedenler % 1'den daha az bir grubu oluşturmaktadır (16).

2.3.3.2.1. Sekonder Obezite Nedenleri

Genetik Sendromlar

Prader-Willi Sendromu
Laurence-Moon-Biedl Sendromu
Down Sendromu
Cohen Sendromu
Carpenter Sendromu
Borseson-Forssmann-Lehmann Sendromu
Beckwith-Wideman Sendromu

Endokrin Nedenler

Cushing Sendromu
Hiperinsülinizm
Büyüme hormonu eksikliği
Hipotiroidi
Psödohipoparatiroidizm
Leptin Bozuklukları

Hipotalamik Bozukluklar

Tümörler (kraniofaringioma)
İnfeksiyon (ensefalit, tüberküloz)
Travma
İnfiltrasyon (lösemi, histiyositoz)
Fröhlich Sendromu

İlaçlar

Glukokortikoidler
Trisiklik antidepresanlar
Antitiroid ilaçlar
Fenotiazin
Sodyum valproat
Östrojen, progesteron
Lityum

2.4. Obezite Ölçüm Yöntemleri

Obezite vücutta aşırı yağlanma anlamına gelmektedir. Ancak aşırı yağlanma tanımını yapabilmek için önce normalin tanımlanması gerekir. Bu amaçla vücuttaki yağ miktarlarını ölçebilecek çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin hepsinde amaç vücuttaki yağ dokusu ile yağ dokusu dışında kalan doku miktarının belirlenmesidir. Vücutta bulunan yağ miktarı direk olarak ölçülebileceği gibi yağ dokusunun yağsız dokuya oranı olarak da ölçülebilir. Vücut dansitesinin hesaplanması (hidrodansitometri), toplam vücut suyunun izotop ile hesaplanması, toplam vücut potasyumunun ölçümü, dual enerji absorpsiyonunun ölçümü, impedans ölçümü, nötron aktivasyonu, tomografi ve magnetik rezonans vücuttaki yağın direkt ölçümü için kullanılan metodlardır. Bu metodlar daha doğru ve güvenilir olmalarına rağmen vücut kitle indeksi (VKİ) güvenli, basit, ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeni ile yaygın olarak çocuklar için epidemiyolojik amaçlı kullanılmaktadır (17).

Vücut yağ oranı, yaygın olarak VKİ ile değerlendirilir ve vücut ağırlığı (kg)/boy(m²) formülü ile hesaplanır. Çocuklarda ise VKİ ve VKİ persentillerini esas alan, birbirine benzer iki uygulama vardır (18). VKİ çocuklarda yaşa ve cinse göre değişiklik gösterir. Yaşa ve cinse göre VKİ'nin persentilleri belirlenmiştir. VKİ 85-95 persentil arasında olanlar fazla tartılı, 95 persentilin üzerinde olan olgular ise obez olarak değerlendirilmektedir (19).

2.5. İnfektobezite Kavramı

Obezite sayısız etyolojisi olan ciddi bir kronik hastalıktır. 1980'den beri prevalansı tüm dünyada dramatik olarak artmıştır. 1960'da ABD'de obezitenin prevalansı %13 iken 1980'de %15'e yükselmiştir. 1980-2000 yılları arasındaki 20 yıllık süreçte obezite prevalansı 10 kat artmış ve 2000'de ABD popülasyonunun %31'i obez olarak tanımlanmıştır. Bu 20 yıllık dönemde obezite yetişkinlerde 2 kat çocuklarda ise 3 kat artmıştır. DSÖ, obezite epidemisinden bahsederek uluslararası obezite ile mücadele komitesini kurmuştur (2). Epidemiyi açıklamada sadece diyet ve yaşam şeklindeki davranış değişiklikleri yeterli değildir. Bu durumun infeksiyöz nedenlere bağlı, özellikle de virüslerle ilişkili olabileceğinin güçlü delilleri mevcuttur (20).

Viral olarak indüklenen obezite yeni bir kavram değildir. 1982 yılından bu yana obeziteye sebep olan beş farklı hayvan virüsü ve bir insan virüsü saptanmıştır (Tablo-1) (20).

Tablo-1: Obeziteye sebep olan hayvan ve insan virüsleri

Hayvan	Canine distemper virus	1982
	Rous-associated virus-7	1983
	Borna disease virus	1983
	Scrapie ajanı	1987
	SMAM-1	1990
İnsan	Adenovirüs 36	2000
	Adenovirüs 37	2002
	Adenovirüs 5	2005

2.5.1. Canine Distemper Virus

Köpek gençlik hastalığı virüsü (Canine Distemper Virus, CDV) Paramyxoviridae ailesinde, Morbillivirus cinsinde yer alır. Etken insanların kızamık virüsü ile yakın antijenik ilişkiye sahiptir. Köpeklerde ve değişik etobur memelilerde solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve santral sinir sistemini (SSS) etkilemektedir. Virüs beynin beyaz cevherindeki nöron ve glial hücrelerde replike olur (21).

CDV'nin obezitedeki rolüne ilişkin ilk çalışmada intraserebral ve intraperitoneal yolla oluşturulan infeksiyonlardan sağ kalan İsviçre albino farelerinin dörtte birinde obezite geliştiği gözlenmiştir. Obez farelerde dolaşımdaki katekolamin düzeyinin düştüğü saptanmış ve infekte hayvanlarda yağ depolamaya spesifik olan adipositlerin toplam sayısının infekte olmayanlara kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte hayvanların SSS'inde herhangi bir hasar görülmemiştir. Bu verilere dayanarak virüsün beyin-katekolamin yolunu etkileyerek obezite oluşturduğu sonucuna varılmıştır (22).

Daha sonra yapılan çalışmalarda CDV'nin hedefi hipotalamus olarak belirlenmiştir. Hipotalamus iştahı düzenlemede, enerji tkretiminde ve nöroendokrin fonksiyonlarda önemli rol oynar (23).

2.5.2. Rous-associated Virus-7

Retroviridae ailesinde yer alan Avian Lkozis Virüsleri (AVL) neoplastik büyüme, osteopetroz ve kronik dejeneratif hastalık gibi proliferasyon defektleri ile birlikte anemi ve immunsupresyon gibi bozukluklar meydana getirir (22).

Carter ve ark.ları (24) yaptıkları çalışmada Rous-associated virus-7 (RAV-7)'nin tavuklarda obeziteyi indüklediğini bildirmişler ve burada şekillenen obezitenin hiperkolesterolemi ve hipertriglisemi sonucu meydana geldiğini sonucuna varmışlardır. İnfekte tavuklarda büyümüş yağlı karaciğer, anemi ve immünsüpresyon görülmüş, gıda alımı aynı olduğu halde obezite gelişmiş ve bunlarda tiroid hormonları düşük bulunmuştur. Bu çalışmada obezite hipotiroidiye bağlansa da, SSS hasarının da mümkün olabileceğini düşünülmüştür.

2.5.3. Borna Disease Virus

Borna disease virus (BDV) tek, negatif iplikli bir RNA virüsüdür ve Mononegavirales sınıfı, Bornaviridae cinsine aittir. Primer olarak sinir sistemini hedefler, ama diğer organlarda da replike olur. BDV enfeksiyonu konakta güçlü bir immun cevap oluşturur ancak virüs sinir sisteminde sınırlı kalır. BDV atlar ve koyunlarda ensefalomyelite neden olur; ancak laboratuvar deneyleri kuşlar, kemiriciler ve primatların da infekte olabileceğini göstermiştir. Virüs sıçanlarda hipotalamusun lenfomonositik inflamasyonu, pankreas adacıklarının hiperplazisi ve yükselmiş serum glukoz ve TG düzeyleri ile İndüklenmiş Obezite Sendromu'na neden olur. Sendromun ciddiyeti kullanılan viral suş, hayvanın genetik temeli ve inokülasyon sırasındaki yaşına göre değişir (25).

Narayan ve ark.ları (26) ile Gosztonyi ve ark.ları (27) yaptıkları çalışmalarda BDV'nin sıçanlarda obeziteye neden olduğunu saptamışlardır. Başka bir araştırmada ise virüsün beyinde septum, hipokampus, amigdala ve

ventromedial hipotalamusta lenfomonositik yangıya neden olarak sinir sisteminde kaldığı, obezite mekanizmasının da SSS hasarına bağlı olduğu düşünülmüştür (28).

2.5.4. Scrapie Ajanı

Scrapie, koyun ve keçilerin SSS'ni etkileyen öldürücü dejeneratif bir hastalıktır ve Nakledilebilir Spongiform Ensefalopatiler (NSE) grubunda yer alır. Scrapie ajanının yapısına ilişkin virino teorisi, virüs teorisi ve prion teorisi olmak üzere üç ana teori vardır. Virino teorisi etkenin sadece virüs gibi işlev gören küçük bir nükleik asit parçası olduğunu savunur. Virüs teorisi etkenin bir virüs olduğunu ancak mevcut virolojik yöntemlerle üretilemediğini ve saptanamadığını savunur. Prion teorisi ise etkenin sadece proteinden oluşan bir yapıya sahip olduğunu ve özellikle sinir hücrelerinde bulunan normal prion proteinlerinin (PrPc) kimyasal yapısını değiştirip kendine benzeterek etkidiğini savunur. Günümüzde en geçerli teori olarak prion teorisi kabul edilmektedir (29).

Günümüzde scrapie ajanının insanları infekte ettiğine dair herhangi bir kanıt yoktur; ancak Sığır Spongiform Ensefalopatisi ve Creutzfeld-Jacobs hastalığına neden olan prionlarla yakın ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Kim ve ark.ları (30) scrapie ajanı ME-7 suşunun farelerde obeziteye neden olduğunu öne sürmüşler ve adrenal bezin çıkarılması ile scrapie ajanının neden olduğu obezitenin engellendiğini göstermişlerdir. Bu durum scrapie ajanının neden olduğu obezitede hipotalamo-hipofizier-adrenal aksın önemli rol oynadığını göstermiştir.

2.5.5. SMAM-1

1970'li yılların ortalarında Hindistan'daki ticari tavuk çiftliklerinde ölüm oranlarında sıra dışı bir artış gözlenmiştir. Bu duruma bir kanatlı adenovirüsünün neden olduğu saptanmış ve etken SMAM-1 olarak adlandırılmıştır. SMAM-1 immun sistemi baskılayan ve vücut yağ oranında artışa neden olan bir etkendir (31).

Dhurandhard ve ark.larının (32) yapmış olduğu çalışmada, tavuklara intraperitoneal yolla SMAM-1 virüsü inoküle edilmiştir. Yaklaşık üç hafta sonra visseral yağ miktarında artış, serum kolestrol ve trigliserit düzeyinde

ise azalma görülmüştür. Bunun yanında, infekte hayvanlarda karaciğerde büyüme ve karaciğerin trigliseritle dolu olduğu saptanmıştır. Etkenin yayılma kabiliyetini saptamak üzere infekte hayvanlarla aynı bölmeye kontrol grubu dışında üçüncü grup olarak sağlıklı tavuklar konulmuş ve bu hayvanlarda da doğal infeksiyon sonucu aynı bulgular meydana gelmiştir. Bu verilere dayanarak, SMAM-1 etkeninin obeziteye neden olduğu ve muhtemelen aerosoller aracılığıyla bulaşabildiği düşünülmüştür.

SMAM-1 etkeninin insan obezitesi ile ilişkisi olup olmadığını anlamak için Hindistan'da 52 obez insanın serumları SMAM-1 antikorları yönünden agar jel presipitasyon testi ile taranmıştır. Test edilen örneklerden 10 tanesi pozitif sonuç verirken, 42 örnek negatif çıkmıştır. SMAM-1 negatif gruba göre SMAM-1 pozitif gruptaki insanların vücut kitle indeksi daha yüksek bulunmuştur. Bu grupta serum kolesterol ve TG düzeyi daha düşük çıkmıştır. Bu verilere göre, SMAM-1 insan obezitesi ile ilişkisi olabileceği ortaya konulan ilk etkindir (33).

2.5.6. Adenovirüsler

1953'de Rowe ve ark.ları (34) çocukların adenoidlerinden hazırlanan kültürlerin spontan dejenerasyonunu uyaran bir etken tanımladılar ve adenoid dejenerasyon ajanı olarak adlandırdılar. 1954'de Hilleman ve Wenner (35) askeri personelin solunum yollarından alınan örneklerde benzer bir etkeni ürettiriler ve RI-67 diye adlandırdılar. Sonrasında bu iki virüsün birbiriyle ilişkili olduğu gösterildi ve 1956'da ilk kaynağını belirtmek üzere adenovirüs terimi önerildi.

İzolasyonlarından kısa bir süre sonra adenovirüslerin çocuklar ve askere alınan bireyler arasında sıklıkla infeksiyon oluşturduğu saptanmıştır. Solunum sisteminin yanı sıra bazı adenovirüs tipleri konjunktivayı infekte etmekte veya çocukluk çağı ishallerine neden olmaktadır. Bunların dışında adenovirüsler aseptik menenjit, ensefalit, hepatit ve hemorajik sistit etkeni olarak da tanımlanabilir. Ayrıca immün sistemi baskılanmış bütün yaş gruplarında yaygın ve ağır seyreden infeksiyonlara da neden olmaktadır (36).

1960'ların ortalarında adenovirüslerin rodentlerde tümör gelişimine neden oldukları saptanmış, ancak virüsün insandaki kanserle bağlantısı ikna

edici bulunmamıştır. Günümüzde adenovirüsler gen tedavisinde vektör olarak kullanılmaya başlanmıştır (37).

2000’li yıllardan beri yapılan birçok çalışmada adenovirüslerin bazı serotiplerinin insan obezitesine sebep olduğu bulunmuştur ve bu yöndeki çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır (20).

2.5.6.1. Adenovirüslerin Sınıflaması

Adenovirüsler yakın zamanda 5 cinse ayrılmış olan adenoviridae ailesinin mastadenovirus cinsinin bir üyesidir. Bu ailede yer alan diğer cinsler Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus ve Ichtadenovirüs’tür (Tablo-2). Mastadenovirüs cinsi yunanca meme anlamına gelen mastos kelimesinden gelir ve memelileri infekte eder. Yaklaşık 19 mastadenovirus türünden 7’si insanları infekte eder ve bu türler A’dan G’ye kadar belirlenmiştir. Her bir insan adenovirüs türünün birçok serotipi vardır ve bugüne kadar 57 insan serotipi tanımlanmıştır (Tablo-3) (38).

Tablo-2: Adenoviridae ailesinin cins, tür ve konakları

Aile	Cins	Tür	Konak
Adenoviridae	Atadenovirüs	D	Omurgalı
	Aviadenovirüs	A	Omurgalı
	Mastadenovirüs	C	Omurgalı
	Siadenovirüs	B	Omurgalı
	Ichtadenovirüs	A	Omurgalı

Tablo-3: İnsanları infekte eden tür ve serotipler

Cins	İnsanları İnfekte Eden Tür	Serotip
Mastadenovirüs	A	12, 18, 31
	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55
	C	1, 2, 5, 6, 57
	D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56
	E	4
	F	40, 41
	G	52

2.5.6.2. Adenovirüslerin Yapısal Özellikleri

Adenovirüsler orta büyüklükte, 70-90 nm çapında, zarfsız, ikozahedral yapıdadır. Her bir partikül yaklaşık 40 genden oluşan, 36 kb'lık, tek ve doğrusal DNA molekülü içerir (39). Virion 252 kapsomerden oluşur ve bu kapsomerlerden 240'ı eşkenar üçgen yüzleri, 12'si ise köşeleri oluşturur. Eşkenar üçgen yüzleri oluşturan kapsomerler hekzon, köşeleri oluşturan kapsomerler ise penton adını alır. Penton bazına bağlı olarak projeksiyon şeklinde uzayan yapısı fiber olarak adlandırılır (36). Adenovirüslerin dış yüzeyinde bulunan bu yapısal elemanlar şeklen oldukları gibi birbirlerinden antijenik yapı olarak da farklıdır. Hekzonlar insan adenovirüsleri, pentonlar tüm adenovirüsler için ortaktır. Fiber antijenleri ise tipe özgüdürler (40).

İnfeksiyöz adenovirüs partikülünden diferansiyel santrifügasyonla alfa, beta ve gama adları verilen 3 ayrı solübl antijen ayrılır. Bunlardan alfa antijeni hekzon kökenli olup gruba özeldir ve bütün insan adenovirüslerinde ortaktır. Beta antijeni penton kökenli olup, toksin benzeri bir etkiye sahiptir. Adenovirüslerin sitopatik etkisinden sorumludur ve gruba özgüdür. Gama

antijeni ise fiber kaynaklıdır. Tipe özgüdür ve hemaglütinin niteliğindedir. Bu antijenden adenovirüs izolatlarının hemaglütinasyon testi ile tiplendirilmesinden yararlanılır (40).

Adenovirüslerin %13'ü DNA, %87'si proteinlerden oluşur. Adenovirüsler yapılarında bulunan guanin (G)+sitozin (S) oranına göre 3 gruba ayrılırlar. Birinci grupta düşük miktarda G+S içerenler (%48-49), ikinci grupta orta derecede G+S içerenler (%50-53) üçüncü grupta ise yüksek oranda G+S içerenler (%58-60) yer almaktadır. Onkojenik etki gösterdiği düşünülen 12,18 ve 31 birinci gruptadır (40).

2.5.6.3. Adenovirüslerin Üreme Özellikleri

Adenovirüsler üredikleri hücreye pinositoz yolu ile girerler. Fiber antijeninin virüsün konak hücreye bağlanmasında önemli rolü bulunmaktadır. İnfekte hücrede adenovirüs replikasyonu 22-25 saat içerisinde tamamlanır. Virüs hücre içerisine alındıktan sonra hekzon ve penton antijenlerinden ayrılarak viral DNA hücre çekirdeğine taşınır. Erken (E) ve geç (L) m-RNA'lar sentezlenir. Viral m-RNA'lar sitoplazmada yapısal proteinleri sentezledikten sonra, bu proteinler çekirdeğe taşınır ve tüm virüs partikülü oluşturulur. Sentezlenen virüs partikülleri otolizis ile serbest hale geçerler (36).

Adenoviral DNA replikasyonu öncesi genom üzerinden 5 farklı bölgeden erken m-RNA sentezlenir. Bunlardan E1 bölgesi adenovirus replikasyonunun başlaması ve düzenlenmesi yönünden önem taşır. Hücre kültürlerinde oluşan transformasyondan ve hayvanlardaki onkojeniteden bu bölge sorumludur (41). E1A RNA sentezini aktive eder ve düzenler. E1B virüsle infekte olan hücrelerin apoptoza gitmesini engeller. E2B DNA polimeraz enzimini kodlar. E3 ve E4 ise viral replikasyonun farklı dönemlerinde rol oynar Her bir hücre başına üretilen 10000-1000000 arasındaki viral partikülden sadece %1-5'i infeksiyözdür (36).

Latent veya persistan infeksiyon, öncelikle bademcikler ve adenoidler gibi lenfoid mukozal dokularda oluşur. Adenovirüsler buralarda bilinmeyen mekanizmalarla varlıklarını sürdürürler ve seyrek olarak replike olurlar (42).

2.5.6.4. Adenovirüslerin Laboratuvar Tanısı

2.5.6.4.1. Mikroskopi

Adenovirüs ile infekte hücreler, histolojik olarak boyanmış dokularda, sıvı sedimentlerinde veya kültürlerde, ışık mikroskopuyla duman lekesi hücreler olarak görülebilirler. Geç dönem infekte hücreler, viral partiküllerden oluşmuş tek santral yerleşimli bazofilik nükleer inklüzyonları içerirler. Sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs veya polyoma virüsün inklüzyonları, adenovirüs inklüzyonlarına benzerler, bu nedenle hatalı tanıdan kaçınmak için ileri değerlendirme önerilir (43).

Klinik örnekte adenovirüs partikülleri veya hücre çekirdeğinde olgunlaşmış virüslerin oluşturduğu kristal yapılar elektron mikroskopi (EM) veya daha hassas ve özgül olan immün elektron mikroskopi (IEM) ile saptanabilir (41). Tespit edilmiş doku parçaları ince kesitlere ayrılarak negatif boyanır ve genellikle nükleus içinde bulunan virüs partiküllerinin kristal dizeleri EM ile incelenir. Sıvı ise yavaş-hızla santrifüjleme ile arındırıldıktan sonra aynı şekilde boyanır ve EM'de partikül kümeleri incelenir. EM bölmeleri üzerine virüsün ultrasantrifüjlenmesi, antihekzon antikorlar ile virüsün ön agregasyonu veya diğer konsantrasyon teknikleri kullanıldığında duyarlılık artar (44). İdrar ve solunum sekresyonlarında adenovirüs tespit etmek için eskiden direk EM kullanılırken, diğer yöntemler daha duyarlı ve pratik olduğundan günümüzde bu yöntem pek tercih edilmemekte, ancak bazı merkezlerde enterik adenovirüslerin saptanmasında kullanılmaktadır (37).

2.5.6.4.2. Antijen Tanımlaması

Antijen tanımlama, solunum yollarının ve gastrointestinal sistemin adenoviral infeksiyonlarında hızlı ve yeterli düzeyde duyarlı sonuçlar verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Adenovirüs antijenleri; immünfloresan (IF), enzim immünoassay (EIA) ve radyoimmün assay (RIA) yöntemleriyle klinik örnekte gösterilebilir (41).

IF'nın en önemli uygulama alanı, solunum yolu örneklerinde virüsün saptanmasıdır. Posterior nazofarenksten eksfolye siliyalı kolumnar epitelyal hücreleri içeren yıkantı, aspirat veya sürüntü örnekleri toplanır. Taze dokunun preparasyonları veya dondurulmuş, tripsinle işlemlenmiş ve formalinle fiske edilmiş doku kesitleri kullanılır. Çalışma, yıkanmış hücre topluluklarının cam lam üzerine çöktürülmesi, asetonla fiske edilmesi, florokrom işaretli monoklonal antikor (MAb) ile boyanması ve floresan mikroskop altında incelenmesiyle uygulanır. Yeterli bir örnek virüse duyarlı elliden fazla hücre içermelidir. Tanıda indirek IF yöntemi de kullanılabilir; ancak doğrudan boyama yöntemleri, mükemmel ve hızlı sonuçlar verir (45). Pozitif hücreler, koyu nükleer veya granüler stoplazmik boyanma sergilemelidir. Boyama adenovirüse özgül MAb veya adenovirüs, respiratuvar sinsityal virüs, influenza A-B virüsleri ve parainfluenza virüs için bir MAb havuzu ile uygulanabilir (46).

IF'nın solunum örneklerinde adenovirüsleri saptamadaki özgüllüğü çok iyidir (>%99). Kültürle karşılaştırıldığında, adenovirüs IF'nın solunum örneklerindeki duyarlılığı %40-60 iken kurumayı kolaylaştıran, okunabilirliği ve örnek yeterliliğini arttıran sitosantrifügasyon yöntemleri kullanarak, daha yüksek (%70-75) duyarlılık elde edilebilir (45).

Antijen saptamada diğer bir yöntem olan enzimimmünassay (EIA)'nın en önemli kullanım alanı, dışkıdaki virüslerin gösterilmesidir. EIA'ların çoğu mikrotitre plakları ve antijen yakalama ve saptama reaktifleri olarak adenovirüse spesifik MAb'lar kullanılır (47). MAb dedektörüne bağlanan enzim subtsrat sistemi tarafından oluşturulan renk değişimi, gözle veya spektrofotometreyle okunabilir. EM veya hücre kültürüyle karşılaştırıldığında, çoğu enterik adenovirüsün EIA duyarlılığı >%90, özgüllük ise %97'dir . Göz ve solunum yolu örneklerinde duyarlılık daha düşük (%65-75) iken, idrarda en düşük saptama oranına sahiptir (48, 49).

İmmünokromatografiyi (IK) içeren diğer antijen testleri, az sayıdaki örneklerin test edilmesi için uygundur. IK'de, örnek membran strip boyunca lateral olarak göç eder, antijen virüs spesifik antikorlara bağlanır ve dakikalar içinde, renkli çizgi gelişir. Hasta başında nazofarengeal örneklerle test edilen

ticari adenovirüs IK duyarlılığı, kültür ve PZR ile karşılaştırıldığında %84'tür (50).

Bir diğer antijen tanımlama testi lateks aglütinasyondur (LA) ki, başlıca kullanım alanı dışkıda cins spesifik adenovirüs saptanmasıdır. Örneklerin %13'ü yorumlanamaz sonuç vermesine karşın, LA'nın EIA'ya benzer duyarlılığı vardır (51). Daha az kullanılan antijen testleri time resolved floreoimmunoassay, radioimmunassay (RIA), counter immunoelectrophoresis (CIE) ve kompleman fiksasyon (KF) testleridir.

2.5.6.4.3. Nükleik Asit Saptama Teknikleri

Nükleik asit saptama testleri viral genomun tespit edilmesinde ileri düzeyde duyarlıdır. Özellikle noninfeksiyöz virüs varlığında, viral yük kültürde saptanamayacak kadar az ise veya sonuçlara hemen gerek duyuluyorsa uygulanabilir (37).

Adenovirüs deoksiribonükleikasiti (DNA) tüm klinik örneklerde saptanabildiği için örnek seçimi hastalığa bağlıdır. Adenovirüs DNA'sını saptamak için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Basit ve hızlı bir yöntem, diyareli çocukların dışkısının lizisinden sonra jelde 36-kb'lık enterik adenovirüs DNA'sı bandının görüntülenmesidir (52). Ekstrakte DNA'nın izotop veya enzim işaretli DNA propları ile hibridizasyonunu kullanan testler duyarlılığı, özgüllüğü ve diğer örnek türlerinde kullanılabilirliği arttırmaktadır. Dot blot hibridizasyon bu amaç için sıklıkla kullanılmıştır (53). Doku örneklerinde insitu hibridizasyon, tanı ve patogenez çalışmalarında yararlılığını korumaktadır (54).

PZR günümüzde en çok kabul edilen saptama yöntemidir. Duyarlılıkları kültüre yakın veya daha fazladır. Testlerin çoğu hekzon geni, lif geni veya RNA 1 ve 2 bölgelerinin dejenere veya nondejenere primerlerini kullanır. Hekzon geni 3 farklı segment içerir. Bunlar yedi çok değişkenli santral bölge ve santral bölgeyi çevreleyen yüksek düzeyde korunmuş iki bölgeden oluşur (55, 56, 57) . Lif geni tür içi korunmuş ve türler arası

değişken bölgeleri içerir. Cins spesifik lif geni primerleriyle de, birkaç PZR tanımlanmıştır (58).

Geleneksel adenovirüs PZR bir iki gün sürer ki bu sürenin çoğu deteksiyon aşaması oluşturur. Saptama yöntemleri olarak etidyum bromid boyalı jeller, işaretli problara katı veya sıvı faz hibridizasyonu, time resolved florometre veya mikropiplaklardaki problara hibridizasyon kullanılabilir. Tek ve multipleks PZR'lar tanımlamıştır. Multipleks konvansiyonel testler A'dan G'ye adenovirüs türlerini ayrı ayrı, birlikte veya solunum virüsleri panelinin bir bileşeni olarak saptayabilir (58, 59, 60).

Real time PZR'lar daha az iş yükü ve konvansiyonel yöntemlerden daha az kontaminasyon ile saatler içinde kalitatif ve kantitatif sonuçlar sağlar. Günümüzde kantitatif real time PZR'ın birkaç sınırlaması vardır. Birincisi testin kalibrasyonu ve laboratuvarlar arasında karşılaştırmada uluslararası bir standardın olmamasıdır. İkincisi tüm serotiplerin uniform olarak saptanması ve kantitasyonu için uluslararası olarak kabul edilmiş bir primer prop kombinasyonu olmamasıdır (55,61). Bunun için mutlak viral yükleri raporlamaktansa, viral kinetikleri (zamanla adenoviral yükteki relatif değişikliği) raporlamak tercih edilebilir (62).

2.5.6.4.4. İzolasyon Yöntemleri

İzolasyon prosedürleri daha ileri çalışmalar için bir temel oluşturur ve kabul edilebilir duyarlılıktadır. Kültür altın standarttır; ancak yavaş olması, istenmeyen organizmaların üreyebilmesi veya toksiteye bağlı hücre ölümü gibi sorunları vardır. Bununla birlikte tüm örnekler rutin kültür için uygundur (37).

Adenovirüsler geleneksel tüp kültüründe veya santrifügasyon kültüründe (SK) izole edilebilir. Çoğalma, insan epitelyal hücre dizilerinde en iyidir. Nonenterik serotiplerin kültürü için insan akciğer karsinom hücre (A549) dizisi önerilir. A549 hücre dizisi adenovirüsleri ve diğer virüsleri iyi destekler (63). Diğer uygun hücre dizileri insan larinks epidermoid kanser hücresi (Hep-2), insan serviks kanser hücresi (HeLa) dir. Maymun böbrek hücresi (Vero)

gibi insan dışı hücrelerde, elde edilen virüs miktarı düşük olmasına rağmen adenovirüsleri üretir. Enterik adenovirüsler en iyi adenovirüs tip beş ile transforme insan embriyonik böbrek hücrelerinin (HEK) sürekli bir dizisi olan Graham 293 hücrelerinde ürer (64).

Sitopatik etkinin (SPE) gelişme hızı hücrenin tipine, örnekteki virüsün serotipine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Epitelyal hücreler tipik olarak adenovirüsün sitopatik etkisini 2 ile 7 gün arasında geliştirirler. Tipik SPE genellikle monotabakanın kenarında başlar ve şişmiş, refraktil hücreler üzüm salkımı benzeri agregasyonlar oluştururlar. Glikolitik aktivite de artabilir, asit salgılanması kültür ortamının renk değiştirmesiyle sonuçlanır (65).

Adenovirüsler SK olan shell vial yöntemi ile hızlıca saptanabilir. Bu teknikte, örnekler hücre kültürü şişelerindeki kaplama slipleri veya mikropklarlarda üreyen hücrelerin üzerine santrifüjlenir. Bir ile beş gün sonra anlamlı SPE gelişmeden önce, intrasellüler hekzon antijenini saptamak için IF uygulanır (66). Adenovirüsleri veya diğer solunumsal virüsleri eş zamanlı saptayan, adenovirüs spesifik antikor veya bir MAb havuzu kullanılabilir (67). Ondört gündeki tüp kültürüyle karşılaştırıldığında, adenovirüslerin SK'de 2 günde boyanarak saptanma duyarlılığı sadece %50 ile %85 arasındadır. Bu saptama oranı, birçok diğer solunum virüsü için daha azdır. Maksimal adenovirüs üretimi için, tüp kültürü veya SK'nin 5 günde boyanması önerilir (37).

2.5.6.4.5. Tiplendirme sistemleri

Tiplendirme, başlıca epidemiyolojik araştırmalar, patogenezi çalışmaları veya özellikle ciddi, olağan dışı bir infeksiyonun nedenini açığa çıkarmak için kullanılır. Serolojik veya moleküler tiplendirme uygulanabilir. Serolojik tiplendirme lif geni ve hekzon geni üzerindeki epitoplardaki farklılıkları saptar. Moleküler tiplendirmede ise lif geni ve hekzon genindeki DNA sekans farklılıkları belirlenir. Bu iki sistem hedefte temel olarak farklıdır, bu yüzden sonuçlar her zaman uyuşmaz (37).

Serolojik tiplendirme izolatin türünü, hemaglutinasyon (HA) ile geçici olarak belirler. Daha sonra hemaglutinasyon inhibisyon (HAI) veya serum nötralizasyon (SN) ile serotiplendirme, o türün her bir serotipini tanımlayan antiserum kullanılarak uygulanır. HAI testi uygulaması daha kolay olmasına rağmen, SN serotipin belirlenmesinde kullanılan altın standart testtir. Diğer serolojik testler immünoperoksidaz tekniği, immün adherans HA ve serotip spesifik antikorla IF'dir (37).

Moleküler tiplendirme hızlı olması ve elde edilmesi zor antiserumlar gerektirmediğinden günümüzde uygulaması artmaktadır. Diğer yaklaşımlar tek zincirli doğrulama polimorfizmlerini ve heterodubleks mobilite analizini içerir (37).

PZR ile tiplendirme günümüzde birçok laboratuvar tarafından tercih edilmektedir. Bu yöntem saflaştırılmış virüs ya da izolattan ekstrakte edilen DNA'nın hekzon geni veya lif geni primerleri kullanılarak ampilifikasyonu ile başlar. PZR ürününün restriksiyon enzimleriyle kesilmesinden sonra oluşan fragmentlerin uzunluğunun ölçülmesi veya DNA sekans analiziyle serotipler belirlenir. Yeterli ürün elde etmek amacıyla nested PZR gerekli olsa da, yeni yöntemler doğrudan klinik örneklerle uygulanabilir (68).

2.5.6.4.6. Serolojik testler

Primer infeksiyonların çoğunda adenovirüs immünglobulin G (IgG) 4 kat artar ve buna bazen IgA yanıtı eşlik eder. Virüs spesifik IgM olguların yalnızca %20-50'sinde görülür (69, 70).

Serolojik tanı, bir IgM yanıtının saptanması veya akut ve konvelasan faz örnekleri arasında IgG'de en az dört kat artışın belirlenmesini gerektirir. Klinik çalışma amacıyla kompleman fiksasyon (KF) veya EIA gibi bir test seçilir. KF ve EIA'nın her ikisi de hekzon antijeni zengin preparasyonlar kullanır ve cins spesifik antikor yanıtlarını saptar. KF en yaygın kullanılan testtir. İyi standardize edilmiştir; reaktifler kolaylıkla edinilebilir. Diğer patojenlere karşı oluşan antikorlar da eş zamanlı çalışıldığında ucuzdur. Ancak en büyük dezavantajı duyarlılığıdır. Duyarlılık infekte eden virüse ve

antijen olarak kullanılan serotipe göre değişir. Bu yüzden daha yüksek duyarlılık ve farklı immünglobülin sınıflarını saptamak için EIA tercih edilmektedir (69).

Serotip spesifik antikor testleri tanısai çalışmalarda sık olarak kullanılmaz. Bu testler, viral izolatların elde bulunmadığı durumlarda infeksiyonlardan sorumlu serotiplerin kesin olarak belirlenmesi, sınırlı sayıdaki serotiple ilişkili hastalıkların tanısı ve immün yanıtla ilgili çalışmalarda değerlidir. En sık kullanılan testler HAI ve SN'dir. HAI testi KF testi gibi çok iyi standardize edilmiştir ve diğer virüslere de uygulanabilir. SN testi serotip spesifik antikor saptamada altın standart testtir (37).

2.5.6.5. Adenovirüslerin Epidemiyolojisi

Adenovirüs infeksiyonları çok sık ve yaygın olarak görülür. Dünyanın bütün coğrafi bölgelerinde epidemi, endemi ve sporadik infeksiyonlara neden olabilir. Tüm solunum yolu infeksiyonlarının %1-5'i ve akut ishalli infeksiyonların %5-15'i adenovirslere bağlıdır. Çocuklar özellikle duyarlıdır ve respiratuvar adenovirüs infeksiyonu prevalansı %2-14 arasında olup, salgınlar sırasında bu oran artmaktadır (71). Aşsız yeni askeri personelin solunum yolu hastalıklarının %30-70'i adenovirüs ile ilişkilidir (72). ocuk yuvaları, yatılı okullar, yaşlı bakım evleri, askeri eğitim kampları ve hastaneler gibi kalabalık kapalı mekanlardaki infeksiyonların insidansı daha yüksektir (37).

Birçok adenovirüs infeksiyonları asemptomatik olarak seyreder. Solunum yolu infeksiyonlarına genellikle B, C ve E türleri neden olur. Adenovirüs tip 1, 2, 5 ve 6 endemik infeksiyonlar oluştururken, adenovirüs tip 4, 7, 14 ve 21 epidemilerden sorumludur. Genellikle salgınlar kapalı topluluklarda rapor edilmiştir. Bazı gelişmekte olan ülkeler ve düşük hijyen koşullarında adenovirüs tip 8, 19 ve 37 oküler infeksiyonlara neden olmaktadır. Adenovirüs 40, 41 tipleri hemen hemen dünyanın her bölgesinde gastroenteritlere neden olmaktadır. Adenovirüs infeksiyonu en sık 6 ay-5 yaş arasındaki çocuklarda solunum yolu infeksiyonu şeklinde görülür. Tip 40 ve 41'in yaptığı gastroenteritler 2 yaşına kadar olan bebeklerde sık olarak görülür (36). Keratokonjunktivitinin büyük epidemileri çoğunlukla 8, 9 ve 37

serotipine bağlıdır. Serotip 3, 4 ve 7'nin küçük salgınları kontamine yüzme havuzu suyuyla ilişkili olarak yaz döneminde oluşur (37).

Transmisyon başlıca solunum veya fekal-oral yollardır. Hava yolu transmisyonu, küçük damlacıklarla ve daha az oranda büyük damlacıklı aerosollerle oluşur. Fekal-oral yayılım muhtemelen çoğu infeksiyonun sorumlusudur. Virüs kontamine banyo mutfak yüzeyleri, parmaklar, oftalmik solüsyonlar ve havadaki parçacıklarla da yayılır. Yayılım, virüsün mide sekresyonlarına, safraya ve pankreatik proteazlara direncinin virüsün mideden geçişine ve barsaklarda replikasyonuna izin vermesiyle de kolaylaştırılmaktadır (37). Adenovirüslere bağlı solunum yolu infeksiyonlarında virüs 1-2 hafta nazofarengeal sekresyonlarda mevcuttur. Enterik infeksiyonlarda ise infeksiyonun başlangıcından birkaç hafta ile birkaç ay arasında virüs feçeste bulunur. Bu süre içerisinde virüsün duyarlı kişilere bulaşması söz konusudur (36). İmmün yetmezlikli hastalar, virüsü immünitesi normal olan bireylerden daha uzun süre yayarlar (37).

2.5.6.6. Adenovirüslerin Oluşturduğu Hastalıklar

Adenovirüslerin insanlarda yapmış olduğu çoğu infeksiyon solunum yollarını, gastrointestinal sistemi ve gözü etkiler. Adenovirüsler idrar yolları, kalp, merkezi sinir sistemi, karaciğer, pankreas ve genital sistem tutulumu da yapabilirler. Ayrıca günümüzde bazı adenovirüs tiplerinin obeziteyle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (20).

2.5.6.6.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları

Adenovirüsler sıklıkla solunum yolu infeksiyonları oluşturmaktadır. Bunların önemli bir kısmında öksürük, burun akıntısı, nezle hali gibi tipik belirtiler hakimdir.

Akut ateşli farenjit

Akut ateşli farenjit sıklıkla küçük çocuklarda görülür. Ateş, öksürük, nazal konjesyon, koriza ve boğaz ağrısı mevcuttur. Diğer viral infeksiyonlardan ve streptokokal farenjitten ayırımı güçtür. Adenovirüs tip 1, 2, 3, 5 ve 7 akut ateşli farenjite sebep olmaktadır (41).

Faringokonjunktival Ateş

Hastalarda üst solunum yolu şikayetlerine ek olarak konjunktivit de gelişirse hastalık faringokonjunktival ateş olarak tanımlanır. Genellikle okul çağındaki çocuklarda sık görülür (73). Klinik belirtiler ateşle birlikte halsizlik, kırıklık, konjunktivit, farenjit ve servikal lenfadenopatidir. Çocuklar arasında zaman zaman epidemiler halinde görülür. Adenovirüs tip 3, 7 ve 14 faringokonjunktival ateşe sebep olmaktadır (40).

Akut Solunum Yolları Hastalığı

Sivil yetişkinlerde adenovirüsle ilişkili akut solunum yolu hastalığının (ARD) yaygın olmamasına karşın askere yeni alınan gençlerde 1953'ten başlayarak salgınlar halinde gözlenmiştir. Semptomlar ateşli soğuk algınlığı benzeri hastalığı, tonsillitle birlikte farenjiti, bronşiti ve pnömoniye içerir. Bazı salgınlarda hospitalizasyon oranı %50'lerdedir ve ölümler bildirilmiştir (56). ARD'nin başlıca sebebi olan adenovirus tip 4 ve 7 için 1971 yılında askeri birliklerde kullanılmak üzere rutin aşı uygulaması başlatılmıştır (74).

2.5.6.6.2. Göz İnfeksiyonları

Akut folliküler konjunktivit, çok bulaşıcı olup adenovirüs tip 11 tarafından oluşturulur ve klamidyaların neden olduğu konjunktivite benzerlik gösterir (75). Çocuklar ve genç erişkinlerde yüzme havuzundan veya göllerden bulaş sonucu da konjunktivit gelişebilir. Konjunktivit bu şekline epidemik keratokonjunktivit (EKC) adı verilir (76). Gemi yapım tezgahlarında çalışanların toz, travma ve durgun su ile karşı karşıya olmaları EKC'in bu bireylerde sık gelişmesine neden olmaktadır. Hastalık göz kapaklarında ödem, ağrı, fotofobi ile seyreden bilateral folliküler konjunktivit şeklindedir. Adenovirüs tip 8, 19 ve 37 EKC'ye yol açar (77).

2.5.6.6.3. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları

Çocukluk çağı ishallerinin çok büyük bir kısmından virüsler sorumludur. Bebekler ve çocuklardaki gastroenteritlerin rotavirüslerden sonra diğer sık görülen nedenlerinden biri de adenovirüslerdir. Adenovirüs tip 40 ve 41, daha nadir olarak da tip 31 gastroenterite neden olur. Yapılan

Çalışmalarda enterik adenovirüslerin çocukluk ağı gastroenteritlerinin %3,1-%13,5'inde sorumlu olduğu gösterilmiştir. Başlıca 6ay-2 yaş arasındaki çocuklar olmak üzere küçük çocuklarda ve kreşte bakılan çocuklarda gastroenterit riski daha yüksektir. Kuluçka süresi 3-10 gündür. Adenovirüs enteriti sıklıkla 10-14 gün gibi uzun süren ishale neden olur (78).

Adenovirüslerle oluşan diğer bir intestinal sendrom tip 1, 2, 5 ve 6'nın sebep olduğu invaginasyondur. Bu sendroma genellikle solunum yolu infeksiyonu öncülük eder ve mezenterik adenit nedeni ile tıkanıklık meydana gelir (79).

2.5.6.6.4. Diğer Hastalıklar

İmmün yetmezlikli hastalardaki klinik altta yatan hastalığa, etkilenen sisteme, hastanın yaşına ve virüs serotipine bağlıdır (80).

Pediyatrik solid organ transplantı veya kemik iliği transplant (KİT) alıcılarında %12 ila %70 oranında adenovirüslerin sebep olduğu mortalite bildirilmiştir (81). Bu hastalarda pnömoni, hepatit, kolit, pankreatit ve dissemine hastalıklar görölmüştür. Özellikle hemorajik sistitin ciddi bir belirti olduğu ve disseminasyonun başlangıcını işaret edebileceği belirtilmektedir (82). Karaciğer transplant alıcılarında adenovirüs %53 gibi yüksek mortalite oranları ile tipik hepatite neden olur. Böbrek transplant alıcılarında predominant semptom %17 fatalite oranıyla hemorajik sistittir. AIDS'li hastalarda diğer fırsatçı patojenlere bağlı infeksiyonlar nedeniyle adenovirüsün saptanmasının klinik önemi açık değildir (37).

Adenovirus tip 2, 19 ve 37 herpes benzeri genital lezyonlardan izole edilmiştir. Hastalarda görölen klinik bulgular üretrit, erkeklerde penil ülser, kadınlarda ise servisit ve labial ülserlerdir. Hastalık 4 hafta sürer ve bu sürede seksüel yolla bulaş söz konusudur (83). Adenovirüslerin beyin omurilik sıvısı ve beyinden izolasyonu oldukça nadirdir. Epidemik akut solunum yolu hastalığı sırasında meningoensefalit ve ensefalit vakaları bildirilmiştir (84). Kardiyak transplantasyon reddiyle ilişkili akut miyokarditte de adenovirüslerin rolü olduğu gösterilmiştir (85).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, adenovirüslerin bazı serotiplerinin insan ve hayvanlarda obezite ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

2.5.6.7. Obezite ile İlişkili Adenovirüsler

2.5.6.7.1. Ad-36

Ad-36 ilk olarak 1978 yılında Almanya'da diyabet hastası ve enterit şikayeti olan altı yaşındaki bir kız çocuğunun dışkılarından izole edilmiştir (22).

Ad-36 D subgenusunda bulunur ve antijenik olarak diğer insan adenovirüslerinden farklı olduğundan onlarla çapraz reaksiyon göstermez (86).

Ad-36 hayvan çalışmaları

Ad-36'nın obeziteyi uyarma kapasitesinin invivo çalışmaları hakkındaki ilk makale Dhurandhard ve ark.ları (87) tarafından yayınlanmıştır. Bu araştırmada tavuklarda üç farelerde ise bir deney yapılmıştır. İlk deneyde 39 tavuk gerektiği kadar gıda ve su alımı açısından izlenmiş ve 3 hafta sonra tavuklar ağırlıklarına göre 3 gruba ayrılmış. Tavuklardan bazal serum kolesterol ve trigliserid (TG) ölçümleri için kan alınmış, bir gruba Ad-36, birinci kontrol grubuna steril besiyeri ve ikinci kontrol grubuna da CELO enjekte edilmiştir. CELO serolojik olarak SMAM-1 ile benzer olan bir kanatlı virüsü olup, obeziteyle bağlantısı saptanmamıştır. Tavuklar 3 hafta sonra değerlendirildiğinde Ad-36 ve CELO grubunda ilgili virüse karşı antikor düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Gıda alımı 3 grupta eşit olarak gözlemlenmiştir. Ad-36 inoküle edilen grupta kontrol grubuna göre visseral ve total vücut yağı anlamlı olarak yüksek, serum TG ve kolesterol düzeyleri ise düşük bulunmuştur. CELO grubunda ise sadece serum TG'i kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İkinci deneyde 16 tavuğa intranazal olarak Ad-36, kontrol grubuna ise steril besiyeri inokule edilmiştir. Bu tavuklar inokulasyondan 5 hafta sonra değerlendirildiğinde Ad-36 ile infekte edilmiş 16 tavuğun 10'nunda Ad-36 antikorları pozitif bulunmuştur. Viral DNA, kas dokusunda saptanmazken visseral yağ dokusunda tespit

edilmiştir. Test ve kontrol gruplarında gıda alımı ve kilo aynı, ancak Ad-36 grubunda visseral yağ %128 ve total vücut yağı %46 daha fazla bulunmuştur. Serum kolesterol ve TG düzeyleri Ad-36 grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Üçüncü deney ikinci deneyin tekrarı olup, farklı olarak inokulasyonda intraperitoneal yol kullanılmıştır. On tavuğa Ad-36, 8 tavuğa ise steril besiyeri inokule edilmiştir. İnokulasyondan 13 hafta sonra tavuklar değerlendirildiğinde Ad-36 ile inokule edilenlerin hepsinde Ad-36'ya karşı antikor saptanmış, infekte tavukların visseral yağ dokusunda viral DNA tespit edilmiştir. Gruplar arasında kilo ve gıda alımı eşit olmasına rağmen, kontrol grubuna göre Ad-36 grubunda visseral yağ %74 daha fazla bulunmuştur. Serum kolesterol ve TG düzeylerinde ise Ad-36 grubunda anlamlı bir düşüklük saptanmamıştır. Kontrol ve Ad-36 grubunun beyin histopatolojisinde herhangi bir fark bulunamamıştır. Dördüncü deneyde 20 fareye intraperitoneal olarak Ad-36, 10 farelik kontrol grubuna ise steril besiyeri verilmiş, 22 hafta sonra Ad-36 ile inokule edilenlerin 19'unda Ad-36'ya karşı antikor gelişmiş ve kontrol grubuna göre kiloları %9, total vücut yağı %35 ve visseral yağ %67 daha fazla bulunmuştur. Tavuk deneyleriyle benzer olarak kontrol grubuna göre Ad-36 grubunda serum kolesterol ve TG düzeyleri anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır (sırayla 38% ve %31). Araştırmacılar Ad-36 infeksiyonuna bağlı olarak beyinde morfolojik bir değişiklik saptamamışlardır. Ancak son zamanlarda insan Ad-36'sı ile sıçanlarda adipositenin indüklendiği, insülin sensitivitesinin arttığı ve sıçan beyinde hipotalamik monoaminlerin değiştiği saptanmıştır (88).

Dhurandhar ve ark.larının (86) yaptığı başka bir çalışmada Ad-36'nın infekte olandan olmayana aktarılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmada infekte olmayan tavuklar Ad-36 ile infekte olanlarla beraber tutulmuş ve 2 saat sonra kan alınarak Ad-36 DNA varlığını saptamak için kapiller elektroforez uygulanarak infekte olmayanların hepsinin infekte olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada Ad-36'nın kan transfüzyonu aracılığıyla geçişini belirlemek için ise infekte tavuklardan infekte olmayanlara 200 µl kan transfüze edilmiş, transfüzyon sonrası tavuklarda Ad-36 infeksiyonu ve obezite geliştiği gözlenmiştir. Bu çalışma etkenin kan yoluyla aktarılabilirliği ve obeziteye neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca Koch postulatlarında geçen "etken hasta bir hayvandan saf olarak izole edilir, aynı tür hayvanlarda üretilir, aynı

hastalığı oluşturur ve tekrar izole edilebilirse o hastalığın nedenidir” ilkesine uygunluk göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışma obezitenin diğer nedenlerle birlikte infeksiyöz etyolojiye sahip bulaşıcı bir hastalık olabileceğini de ortaya koymuştur (86).

Kapila ve ark.ları (89) hamsterlerde Ad-36 ile yaptıkları çalışmada bir gruba Ad-36, kontrol grubuna ise steril besiyeri inokule etmişler, Ad-36 inoküle edilen hayvanların akciğer, karaciğer, visseral adipoz doku ve iskelet kasında Ad-36 DNA'sını saptamışlardır. Bu çalışmada plazma kolesterolü iki grupta eşit olup, Ad-36 inokule grupta LDL kolesterol daha yüksek bulunmuştur.

Ad-36 ile ilgili olarak primatlarda iki çalışma yapılmıştır. Wisconsin Üniversitesi Primat Merkezi'nde yedi yıl boyunca tüm serum örneklerine Ad-36 antikorlarını taramak için serum nötralizasyon testi uygulanmış ve Ad-36'nın diğer adenovirüslerle çapraz reaksiyona girmedeği görülmüştür. Daha sonra deneye eklenen 15 tane Rhesus maymunundan yedi tanesine Ad-36 inoküle edilmiştir. Deney grubundaki hayvanlarda 18 ay sonra vücut ağırlığında %15 artış, serum kolesterol düzeylerinde ise %25 düşüş saptanmıştır. İkinci çalışmada ise marmoset maymunları kullanılmış, kullanılan altı maymunun üç tanesine Ad-36 intranazal yolla inokule edilmiş ve yedi ay sonunda infekte hayvanlarda vücut ağırlığında dört kat, visseral yağ dokuda %66 artış görülmüştür. Serum kolesterol düzeylerinde ise 34mg/dL azalma meydana gelmiştir. Virus maymunların dışkılarından iki aya kadar izole edilebilmiş, fakat sonrasında izolasyon yapılamamıştır. Deneyin yedinci ayında beyin, akciğer, karaciğer, kas ve yağ dokuda PZR ile viral DNA saptanabilmiştir. Bu veriler Ad-36'nın viremi döneminde vücudun çeşitli dokularına dağılabildiğini, fakat infeksiyöz virüsün iki aya kadar yayılabildiğini göstermiştir (90).

Ad-36 İnsan Çalışmaları

Üç Amerika şehrinden (Madison WI, Naples FL ve New York NY) obez olan (BMI>30, n=360) ve olmayan (n=142) gönüllülerin serumları Ad-36 antikor varlığı, TG ve kolesterol seviyeleri yönünden incelenmiştir. Obez olmayan grubun yaş ortalaması obez grubunkinden düşük ($p<0.001$), Ad-36

antikor pozitif vakaların ortalama yaşı Ad36 negatif vakalarinkine benzer bulunmuştur. Ad-36 antikor obezlerin %30'unda ve obez olmayanların ise %11'inde pozitif saptanmıştır. Her iki grupta da Ad-36 antikor pozitif olanların BMI'ları ve serum kolesterol düzeyleri, negatif olanlara göre daha yüksek tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Serum TG'leri sadece Wisconsin bölgesinde insanlarda ölçülmüş ve TG düzeyi Ad-36 antikor pozitif olanlarda negatif olanlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.0001$) (91).

Atkinson ve ark.larının (91) yaptıkları başka bir çalışmada 89 ikiz çiftin serumlarında Ad-36 DNA'sı ve antikoru araştırılmıştır. Yirmialtı ikiz çiftte (20 tek yumurta, 6 çift yumurta ikizi) Ad-36 antikorları bulunamamıştır. Bu ikizlerin BMI'ları, serum kolesterol ve TG düzeyleri ölçülmüş, ayrıca bu vakaların dual enerji X-ray absorptiometre, hidrodensitometre ve/veya bioempedans ile vücut yağ ölçümleri yapılmıştır. Ad-36 pozitifler Ad-36 negatif kardeşlerine göre daha ağır ve yağlı olarak bulunmuştur. Antikor pozitif vakaların ortalama BMI'sı 26.1 ve ortalama tüm vücut yağı 29.6 iken, kontrol grubunda bu değerler sırasıyla 24.5 ($p<0.04$) ve 27.5 ($p<0.04$) olarak tespit edilmiştir. Serum kolesterol ve TG düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

2.5.6.7.2. Ad-37

Whigham ve ark.larının (92) tavuklarda yaptıkları çalışmada Ad-37, Ad-31 ve Ad-2'nin obeziteyle ilişkisi araştırılmıştır. Ad-2 ve Ad-31'in artmış yağ depolanmasına neden olmadığı saptanmış, ancak Ad-37 ile infekte tavukların kontrollere göre vücut yağının %111 ve visseral yağı %262 arttırdığı görülmüş. Farklı virüslerle infekte gruplarla kontrol grupları arasında gıda alımı yönünden fark saptanmamış. Araştırmacılar Ad-37'nin tavuklarda yaptığı obeziteyi enerji harcamadaki değişimlere bağlamışlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda serum kolesterol düzeylerinde azalmaya neden olan Ad-36'ya zıt olarak, bu çalışmada Ad-37'nin kolesterol düzeyini %25 arttırdığı görülmüştür. Ad-37'nin serum TG düzeyini ise %51 azalttığı saptanmıştır. Serum lipidleri Ad-2 ve Ad-31 ile değişiklik göstermemiştir.

Atkinson ve ark.ları (91) yaptıkları çalışmalarda ayrıca Ad-2, Ad-31, ve Ad-37'ye karşı antikorları da araştırmışlar, ancak antikor pozitif ve negatif

kişiler arasında BMI veya serum lipidleri açısından hiç bir fark saptayamamışlardır. Atkinson ve arkadaşlarının yaptığı ikiz çalışmasında Ad-2, Ad-31 ve Ad-37 antikorları açısından uyumsuz ikiz çiftlerinde BMI veya vücut yağı yüzdeleri fark göstermemiştir.

2.5.6.7.3. Ad-5

So ve ark.ları (93) yaptıkları çalışmada farelere intraperitoneal olarak Ad-5 inoküle etmişler ve gıda alımında fark olmayan kontrol grubuna göre inoküle grubun vücut yağında yaklaşık %300 artış olduğunu saptamışlardır. Farelerin vücut yağı kimyasal olarak değil proton manyetik rezonans spektroskopisiyle ölçülmüş, karaciğerde de bu methodla yağ depolanması saptanmıştır. Bu çalışmada serum lipidleri ölçülmemiştir. Araştırmacılar virüsün yeni yağ hücre diferansiasyonunu arttıran ve obeziteye yol açan peroksizom proliferator-aktive olmuş reseptor- γ üretimini uyarabileceğini düşünmüşlerdir.

2.5.6.8. Viral Obezitenin Mekanizmaları

Günümüzde virüslerin neden olduğu obezite için beraber veya tek başına rol oynayabilecek birçok farklı mekanizmalar öne sürülmüştür.

Ad-36 beyin ve vücutta gıda alımına karşı güçlü bir arzu uyandıran değişiklikler oluşturur. Ancak hayvan çalışmalarında Ad-36 inoküle edilmiş ve edilmemiş kontrol grubundaki hayvanlara istedikleri kadar yiyecek verilmesine rağmen, Ad-36 ile inoküle olmuş hayvanlar kontrol grubundaki hayvanlardan daha fazla yememişlerdir. Bu nedenle Ad-36'nın tetiklediği obezitede ana sebebin gıda alımındaki artış olamayacağı varsayılmıştır (94).

Dhurandhar ve ark.larının (87, 88) yapmış olduğu çeşitli hayvan deneylerinde beyinde Ad-36 enfeksiyonundan kaynaklanan herhangi bir morfolojik değişiklik bulunamamıştır. Ancak son yıllarda Pasarica ve ark.larının (94) sıçanlarda Ad-36 ile yaptıkları çalışmada, paraventriküler nükleusta norepinefrin düzeylerinin infekte sıçanlarda kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptanması SSS'deki değişikliklerin de Ad-36 ile indüklenen obezite etyolojisinde yer alabileceğini göstermektedir. Bu nedenle infekte bireylerde obezitenin beyin kimyasındaki değişikliklerden kaynaklanabileceği varsayılmıştır.

Lipit metabolizmasında en önemli organlardan biri karaciğerdir. Bu nedenle Ad-36'nın karaciğer fonksiyonlarına etkisi olması olasıdır. Ancak yapılan çalışmalarda karaciğerde herhangi bir morfolojik veya kimyasal değişim bildirilmemiştir. Bu nedenle Ad-36'nın karaciğerde, obeziteyi güçlendiren değişiklikleri indükleyebileceği düşünülmektedir (87, 90, 94)

Son zamanlara kadar adipoz doku pasif bir organ olarak görülse de artık endokrin bir organ gibi davrandığı bilinmektedir. Leptin büyük oranda beyaz yağ dokudaki adipositlerden salgılanan, iştahı azaltan ve enerji harcanmasını artıran bir hormondur. Primer olarak hipotalamik reseptörler üzerine etkiyerek gıda alımını azaltır ve metabolizma hızını artırır. Leptinin yeterli düzeyde üretilmediği durumlarda yağ depolanmasının daha fazla olduğu gösterilmiştir (92). Leptinden başka adipoz dokudan preadiposit ve adipositleri etkileyen birçok sitokin salgılanır (95). Obezitede tümör nekrozis faktör -alfa (TNF-alfa) adipoz dokudan salgılanır ve insülin direncinden sorumlu olabilir. Obez bireylerde artmış interlökin-6 (IL-6) ve C-reaktif protein (CRP) seviyeleri gözlenmiştir (96).

Genel olarak enfeksiyona cevapta IL-12 interferon-gama (IFN-gama)'yı indükleyerek IL-18 ile birlikte T helper-1 (Th-1) immün cevabını oluşturur. Ancak Ad-36 enfeksiyonun erken safhalarında bu sitokinlerin üretimini baskılayarak Th-1 cevabını azaltır. Bu sitotoksik immün cevabın azalması Ad-36 ile enfekte adipoz dokuda hücrelerin sağ kalmasına neden olur (97).

Ad-36'nın sebep olduğu artmış adipositeden sorumlu mekanizmalar birçok enzimin, transkripsiyon faktörünün ve gen ekspresyonunun virüsle değişimini içerir. Adipositlerde sterol regülatör elemanı bağlayan protein yolağı artar ve sterol regülatör eleman bağlayıcı protein 1 ve yağ asidi sentezinde artış olur. Transkripsiyon faktör CCAAT/kolaylaştırıcı bağlayıcı protein-beta, peroksizom proliferatör aktive reseptör gama ve lipoprotein lipaz düzeyleri yükseldiği için hücre içinde yağ asidi sentezi artar. Kas hücrelerinde glukoz transportundan sorumlu Glut-1, Glut-4 ve fosfoinozid 3 kinazın gen ekspresyonu artar ve bu da glukoz transportunda noninsülin kökenli artışla sonuçlanır (98).

Yapılan bir çok çalışmada hayvanların adipoz dokusunda Ad-36 DNA'sı PZR ile saptanmıştır. Bu çalışmalarda enfekte hayvanlardan alınan yağ pedleri enfekte olmayanlardan daha büyük olarak saptanmış, yağ

hücrelerinin boyutu ve sayısında da artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Ad-36'nın periferik etkisinin doğrudan yağ hücrelerinde olduğunu düşündürmektedir (86, 87, 90).

Vangipuram ve ark.ları (99) Ad-36 ile yaptıkları diğer bir çalışmada adiposit diferansiasyon göstergesi olan gliserol 3 fosfat dehidrogenazın infekte olmayan preadipositlere göre infekte olanlarda çok daha hızlı arttığını 3T3-L1 hücreleri ve insan preadipositleri kullanarak bildirmişlerdir. Aynı zamanda oilred-O boyası kullanarak TG'lerin infekte preadipositlerde çok daha hızlı biriktiğini göstermişlerdir.

Vangipuram ve ark.larının (100) yaptıkları başka bir araştırmada Ad-2, Ad-9, Ad-36 ve Ad-37'nin, leptin sekresyonu ve lipid depolanması üzerine etkisini araştırmak üzere invitro olarak 3T3-L1 ve A549 hücrelerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ad-2'nin hücreler üzerinde herhangi bir etkisi görülmezken, diğer etkenler (Ad-9, Ad-36, Ad-37) ile infekte 3T3-L1 hücrelerinde leptin mRNA sentezinin baskılandığı ve bu hücrelerde lipid birikiminin arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada doku kültürü hücrelerinde Ad-9'un yağ birikimini arttırdığı gösterilmiş, ancak Ad-9 ile invivo bir çalışma yapılmamıştır.

Ad-36'ya bağlı obezite virüsün open reading frame 1 early region 4 geninin etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Bunu kanıtlamak amacıyla yapılan bir başka çalışmada Ad-36'nın open reading frame 1 early region 4 geni retrovirüslere transfer edilip invitro olarak preadipositlere sokulduğunda yağ birikimini arttırdığı görülmüştür (101).

Rathod ve ark.larının (102) 3T3-L1 hücrelerinde yaptığı çalışmada Ad-36'nın open reading frame 1 early region 4 gen ekspresyonu cidofovir kullanılarak azaltılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 2009-2011 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Çalışma iki aşamalı olacak şekilde tasarlandı. Birinci aşamada Celal Bayar Üniversitesi'nden (solunum-kan, n=88), Kocaeli Üniversitesi'nden (göz-çevresel, n=94) ve Ege Üniversitesi'nden (göz-solunum, n=18) sağlanan klinik örneklerden toplumda dolaşan adenovirüs serotipleri belirlendi ve obezite ile ilişkili serotipler nötralizasyon deneylerinde kullanılmak amacıyla hücre kültüründe üretildi. İkinci aşamada ise 2009-2011 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Endokrinoloji Polikliniği'nden obez (n=60) ve obez olmayan (n=60) 120 çocuktan, velilerine çalışma anlatılıp onam formu doldurulduktan sonra 10'ar ml kan örneği alınarak santrifüjlendi ve serumlar adenovirüs IgA, IgM, IgG, HDL, LDL, TG, kolesterol, leptin düzeyleri ve mikronötralizasyon testi yapılmak üzere çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.1. Adenovirüslerin Tiplendirilmesi

Üç ayrı merkezden sağlanan toplam 200 örnekten DNA ekstrakte edildikten sonra, Lu ve Erdman'ın (103) daha önce tanımladığı Adhex F1 ve Adhex R1 primerleri ile amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforeziyle pozitif olduğu belirlenen örnekler pürifiye edildi. Negatif bulunan örneklerle nested PZR uygulandı. Pozitif örnekler sekanslanarak, ardından blast analizi ile tiplendirildi.

3.1.1. Viral DNA izolasyonu

Göz, solunum yolu ve çevresel örneklerden viral DNA izolasyonunda Qiagen Minelute Virus Spin Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), kan ve vücut sıvılarından viral DNA izolasyonunda ise Qiaamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kullanıldı.

3.1.1.1. Göz, Solunum Yolu ve Çevresel Örneklerden Nükleik Asit İzolasyon Protokolü

- 25 µl QIAGEN Protease 1.5 ml'lik tüpe koyuldu.
- Tüpe 200 µl örnek eklendi.
- Örnek başına 220 µl Buffer AL + 6.2 µl carrier RNA hazırlandı. Bu karışımdan 200 µl alınarak örneğin üzerine eklendi.
- 56°C'de 15 dakika bekletildi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için çok kısa santrifüj edildi.
- Örneğin üzerine 250 µl etanol eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 saniye vortexle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika tutuldu.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için çok kısa santrifüj edildi.
- Tüpün içindeki sıvının tamamı bir QIAamp MinElute kolonuna çeperine dokunmadan dikkatlice koyuldu. Kapağı kapatılıp 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1.5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.
- QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1.5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.
- QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz

bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı.

- QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µl etanol eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. İçinde sıvı biriken toplama tüpü atıldı.
- QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi. Maksimum hızda; 14 000 rpm. 3 dakika santrifüjlenerek kolonun tamamen kurutulması sağlandı.
- QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi ve membranın tamamen kuruması için 56 °C'de 3 dakika bekletildi. Bu aşama, varsa kalan sıvının buharlaşmasını sağlar.
- Kolon 1.5 ml'lik temiz bir tüpün içine yerleştirildi ve içinde sıvı biriken toplama tüpü atıldı. Kapak dikkatlice açıldı ve tam ortasına 43 µl Buffer AVE koyuldu. Kapağı kapatıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Maksimum hızda; 14 000 rpm. 1 dakika santrifüjlendi.
- Alttaki 1.5 ml'lik tüpte toplanan sıvı DNA örneği olarak ayrıldı.

3.1.1.2. Kan ve Vücut Sıvılarından Nükleik Asit İzolasyon Protokolü

- 20 µl QIAGEN Protease 1.5 ml'lik tüpe koyuldu.
- İçine 200 µl swap içerisindeki sıvı eklendi.
- Örneğin üzerine 200 µl Buffer AL eklenip tüpün kapağı kapatılarak 15 saniye vortexle karıştırıldı.
- 56°C'de 10 dakika bekletildi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için çok kısa santrifüj edildi.
- 200 µl etanol (%96-100) eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 saniye vortexle karıştırıldı. Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için çok kısa santrifüj edildi.
- Tüpün içindeki sıvı 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirdiğimiz QIAamp kolonuna dikkatlice koyuldu. Kapağı kapatılarak 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alttaki 2 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla

birlikte atıldı ve kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi.

- Kolon dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapağı kapatılarak 8000 rpm. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi.
- Kolon dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapağını kapatılarak maksimum hızda 3 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon 1.5 ml'lik temiz bir toplama tüpünün içine yerleştirildi.
- Kapak dikkatlice açıldı ve tam ortasına 100 µl Buffer AE koyuldu. Kapağı kapatıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi.
- Altaki 1.5 ml'lik tüpte toplanan sıvı DNA örneği olarak ayrıldı.

3.1.2. PZR

Ad hex F1-R1 primerleri [Ad hex F1 (nt 19135–19160; 5' - TICTTTGACATICGIGGIGTICTIGA-3') ve Ad hex R1 (nt 20009–20030; 5' - CTGTCTACIGCCTGRTTC CACA-3')] kullanılarak ilk tur PZR yapıldı, PZR ürünü elde edilen örneklerden Ad hex F1 primeri ile dizileme işlemi yapıldı (103).Aşağıdaki şemaya göre PZR miksi hazırlandı;

Sybr super mix	12.5 µl
ADV Hex F1 primer	2.5 µl
ADV Hex R1 primer	2.5 µl
Kalıp DNA	5 µl
dH2O	2.5 µl
Toplam hacim	25 µl

Amplifikasyon protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

95°C 15:00 dk.	
94°C 01:00 dk.	} 40 döngü
45°C 01:00 dk.	
72°C 02:00 dk.	
72°C 5:00 dk.	

PZR aşamasından sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde konsantrasyonları belirlenmek üzere yürütüldü. Agaroz jelde bant yoksa veya silikse ilk PZR ürünü kullanılarak Ad hex F2-R2 primerleri [Ad hex F2 (nt 19165–19187; 5' -GGYCCYAGYTTTAAARCCCTAYTC-3') ve Ad hex R2 (nt 19960–19985; 5' -GGTTCTGTCICCCAGAGARTCIAGCA-3')] ile nested PZR yapıldı ve ürünler Ad hex F2 primeri ile dizilendi.

3.1.2.1. Agaroz Jelde Yürütme ve Görüntüleme

- Parafilmin üzerine 1 µl Fermentas boya (loading buffer) koyuldu.
- Üzerine 3 µl PZR ürünü ya da 1 µl Fermentas marker koyuldu.
- Örnekler ve marker üzerine 1 µl SYBRgreen I eklendi.
- Mikropipet toplam hacme ayarlandı.
- Örnekler mikropipetle bir iki defa karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
- Voltaj 170 volta ayarlandı, 15 dakika yürütüldükten sonra görüntülendi.

3.1.2.2. PZR sonrası saflaştırma işlemi

Bu amaçla High Pure PZR Product Purification kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Saflaştırma işlemi aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- 50 µl'lik PZR ürününün üzerine 250 µl "Binding Buffer" koyuldu, iyice karıştırıldı.
- Filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirildi.

- Örnek filtreli tüpe koyuldu.
- 12.500 rpm.'de bir buçuk dakika santrifüjlendi.
- Aşağıya geçen sıvı atıldı.
- 500 µl "Wash Buffer" eklendi.
- 12.500 rpm.'de bir buçuk dakika santrifüjlendi.
- Aşağıya geçen sıvı atıldı
- 200 µl "Wash Buffer" eklendi.
- 12.500 rpm.'de bir buçuk dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atıldı ve filtreli tüp 1.5 ml'lik temiz bir tüpe yerleştirildi.
- 30 µl "Elution Buffer" eklendi.
- 12.500 rpm.'de bir buçuk dakika santrifüjlendi.
- Dipte toplanan sıvı DNA örneği olarak ayrıldı.

Saflaştırma işleminden sonra örnekler tekrar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntülendi.

3.1.3. Dizileme Reaksiyonu

Her bir örnek PZR cihazında; Sequence Reagent Mix -DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA) varlığında dizileme reaksiyonuna alındı.

ADV F1 ya da ADV R1'den 0,6 µl, Sequence Reagent Mix'den 3µl ve örnek konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek konsantrasyonlu örneklerden yaklaşık 2-3 µl, düşük konsantrasyonlu örneklerden maksimum 6.4 µl alınarak toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon basamakları aşağıdaki şekilde uygulandı.

95°C----	00.20 sn	} 35 döngü
50°C----	00.25 sn	
60°C----	02.00 dk	
4 °C-----	10.00 dk	

Dizileme reaksiyonu öncesi örneklere Sodyum Asetat ve Et-OH varlığında saflaştırma işlemi yapıldı.

- Reaksiyon bittikten sonra her tüpe 1 µl 1.5M sodyum asetat, 10 µl dH₂O ve 80 µl 100% etanol eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- Tüpler 12500 rpm.'de 15 dk. santrifüj edildi ve sıvı faz vakum mikropipet ile çekilerek atıldı.
- Dibe çöken kısmın üzerine 200 µl 70% etanol eklendi, vortekslemeden 12500 rpm.'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Sıvı faz mikropipet ile çekildikten sonra dibe çöken kısım termomikser cihazında 56 °C'de 10 dk. kurutuldu.
- Çökeltinin üzerine 15 µl template suppression reagent eklendi. Tüpler 10 saniye vortekslendikten sonra Otomatik DNA Dizi Analizi Cihazı ABI 310'a yüklendi.

Tüm ürünler otomatik ABI PRISM 310 Genetic Analyzer'da (Applied Biosystems Inc. California, ABD) dizilendi. Elde edilen ADV sekansları BLAST analizi ile tiplendirildi. Bu amaçla nükleotid database blast (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences) kullanıldı.

3.1.4. Filogenetik Analiz

Üç ayrı merkezden toplanan örneklerden elde edilen adenovirüs serotiplerinin filogenetik ağaç analizi UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) metodu ile 1000 bootstrap tekrar değerine göre CLC SequenceViewer 6.0.2 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark) software program kullanılarak yapıldı. ADV nükleotid sekansları uluslararası DNA data bank (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB) dan elde edilen dizilerle karşılaştırıldı.

3.2. Çalışma grubu

Ağırlık, 50 gram hassasiyette ölçüm yapabilen mekanik terazi ile boy ölçümü 0,1 cm'lik ölçüm yapabilen duvara monte boy ölçer ile yapıldı. VKİ kg/m² yaş ve cinse göre persentilleri obezite indeksi olarak kullanıldı. Obez gruptaki 60 çocuğun VKİ yaş ve cinse göre 95 persentil ve üzerinde, obez olmayan gruptaki 60 çocuk ise 85 persentilin altındaydı. Çalışma grubundan alınan serum örneklerinde aşağıdaki testler (parametreler) çalışıldı.

3.2.1. Adenovirüs spesifik antikor IgA, IgM, IgG

Çalışma grubunun serum örneklerinde adenovirüs spesifik IgA, IgM ve IgG antikorları EIA yöntemi ile (Radim, İtalya) ticari kit kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

3.2.2. Biyokimyasal testler

Çalışma grubunun serum kolesterol, TG, HDL ve LDL biyokimyasal parametrelerinin ölçümü yapıldı. Serum TG, HDL, total kolesterol düzeyleri orijinal ticari kitlerle çalışıldı (Beckman Coulter Ireland Inc. Mervue, Galway, İrlanda, UniCel DxC 800 Synchron Clinical System, Fullerton, CA, ABD). Düşük dansiteli kolesterol düzeyi Friedwald ve Frederickson formülü ile hesaplandı.

3.2.3. Leptin düzeyi

Çalışma grubunun serum leptin düzeyleri Human Leptin ELISA Kit (Cat No KAC2281. Invitrogen Corp. Camarillo, CA, USA) kullanılarak EIA yöntemi ile üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Testin analitik duyarlılığı 0-1000 pg/ml arasındaydı.

3.2.4. Serum Nötralizasyon Testi

Çalışma grubunu oluşturan (n=60, obez olan; n=60, obez olmayan) 120 çocuğun serumlarında Ad-5, Ad-8 ve Ad-36 serotip spesifik antikorları saptamak amacıyla altın standart olarak kabul edilen mikro-nötralizasyon testi uygulandı. Mikro-nötralizasyon testi sabit virüs-azalan serum metoduyla yapıldı.

3.2.4.1. Virüslerin Üretilip Stoklanması

Tiplendirme sonucu Ad-8 ve Ad-5 olarak saptanan ve taşıma besiyerinde gelen solunum örneklerinin üzerine 3 ml antibiyotikli MEM sıvısı koyarak 30 sn vortekslendi. Daha sonra 1000g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatandan Hep-2 hücresi ihtiva eden flakslara ekim yapıldı. Üzerine 100 ml Eagle's minimum essential medium (MEM-Earle), 10 ml fetal calf serum (FCS), 2 ml L-glutamin (200 Mm), 1 ml HEPES (1 M), 1 ml penisilin-streptomisin solüsyonu (10.000 mg/ml), 0.1 ml gentamisin solüsyonu (10 mg/ml), 0.4 ml amfoterisin-B solüsyonu (250 mg) şeklinde hazırlanan sıvıdan 4 ml ilave edilerek 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Hücreler belirli aralıklarda sitopatik etkinin varlığı açısından kontrol edildi. SPE gözlemlendikten sonra hücrelerin flakslardan kolay ayrılması için birkaç kez elle vurularak hücreler döküldü ve toplandı. Ad-8 ve Ad-5 serotiplerini içeren süpernatantlardan ve ticari olarak elde edilen Ad-36 (ATCC VR-1610)'dan, Hep-2 ihtiva eden flakslara ekim yapıldı. Tek bir flasktan alınan virüsler taze hücreli bir flaska aktarıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlanarak homojen virüs stoğu oluşturuldu. Oluşturulan virüs stokları sekans analizi ile tekrar tiplendirilerek serotipler doğrulandı. Stoklar -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

3.2.4.2. Doku Kültürü İnfektif Doz (DKID)

İnfektif titre, virüsün canlı sistemlerde oluşturduğu %50 pozitif reaksiyonların görüldüğü son dilüsyondur. İnfektif doz ise virüs süspansiyonu

içinde bir inokulum miktarında bulunan virüs ünitesini ifade eder ki bu da, infektif titrelerin pozitif logaritmasıdır.

Ad-8, Ad-5 ve Ad-36 ile oluşturduğumuz stoklardan; antibiyotikli MEM dilüent olarak kullanılarak 10^{-1} 'den 10^{-9} 'a kadar virüs dilüsyonları hazırlandı. Bu dilüsyonlardan 0,1 ml Hep-2 hücresi ihtiva eden mikropleytlere ekilerek 37 °C' de % 5 CO₂' li inkübatörde 5 gün inkübe edildi. Beşinci gün mikropleytlerdeki SPE değerlendirilip oluşturulan tablolara var-yok şeklinde rapor edildi. Tablolar değerlendirilerek Spaerman-Kaerber hesaplama yöntemi ile her bir serotipin DKID-50'leri bulundu.

3.2.4.3. Hep-2 Hücrelerinin Hazırlanması

Flasklarda tam tabaka halinde bulunan Hep-2 hücrelerinin üzerindeki besiyeri alındıktan sonra pH'ı 7,2 olan PBS ile çalkalanarak yıkandı ve PBS atıldı. 37°C'ye getirilmiş olan tripsin/EDTA (L2143, Biochrom AG, Berlin, Germany) solüsyonu tabaka halindeki hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde kondu ve 5 dakika 37°C' de % 5 CO₂' li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin flasklardan kaldırılması sağlandı. Üzerine 1-2 ml MEM eklenerek 5-10 dakika 200g'de santrifüjlendi ve üstteki besiyeri alınarak ml'de 300000 hücre olacak şekilde FCS konarak süspanse edildi.

3.2.4.4. Serum örnekleri

Çalışma grubunun serumları -20°C'den çıkarılarak çözöldükten sonra Benmari'de 56°C'de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi. İnaktive edilen serumlar steril ependorflara alınarak MEM ile 1/10'luk (0,2 ml inaktive serum, 1,8 ml MEM) dilüsyonları hazırlandı.

3.2.4.5. Mikro-nötralizasyon testi

Her bir serum ve her bir virüs serotipi için 96 kuyucuklu mikropleytin 4 kuyucuğu kullanıldı. Üst 2 kuyucuğa 1/10 dilüsyondaki hasta serumundan 200 ul koyuldu. Alt 2 kuyucuğa ise 100 µl MEM koyuldu ve üst kuyucuklardan 100 ul aktarıp karıştırdıktan sonra 100 µl dışarıya atılarak 1/20 serum dilüsyonları hazırlandı. Kuyucukların her birine ilgili adenovirüs serotipinin stoğundan hazırlanan 100 DKID50'den 100 µl eklendi. 37 derecede 1 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 300000/ml olacak şekilde hazırlanan Hep-2 hücrelerinden 100 µl eklendi.

96 kuyucuklu mikropleytin her biri için 1DKID-50, 10 DKID-50 ve 100 DKID-50 için 4 kuyucuktan oluşan 3 ayrı virüs kontrol (virüs var, hücre var, serum yok) ve 4 kuyucuktan oluşan 1 adet hücre kontrol (sadece hücre var) hazırlandı. Plaklar 37°C' de %5 CO₂' li inkübatörde 5 gün inkübe edildikten sonra SPE var/yok şeklinde iki ayrı uzman tarafından değerlendirilip sonuçlar yorumlandı.

3.3. İstatiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 10.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenler için betimleyici istatistikler (ortalama, standart sapma, frekanslar) hesaplandı. Nümerik değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda Student's t testi, kategorik değişkenlerde yüzdeler arasındaki farkın önemlilik testi olarak ki kare testi kullanıldı. Leptin düzeyinin kesme noktasını belirlemek amacıyla ROC analizi uygulandı. Tüm istatistiksel analizlerde p<0.05 istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

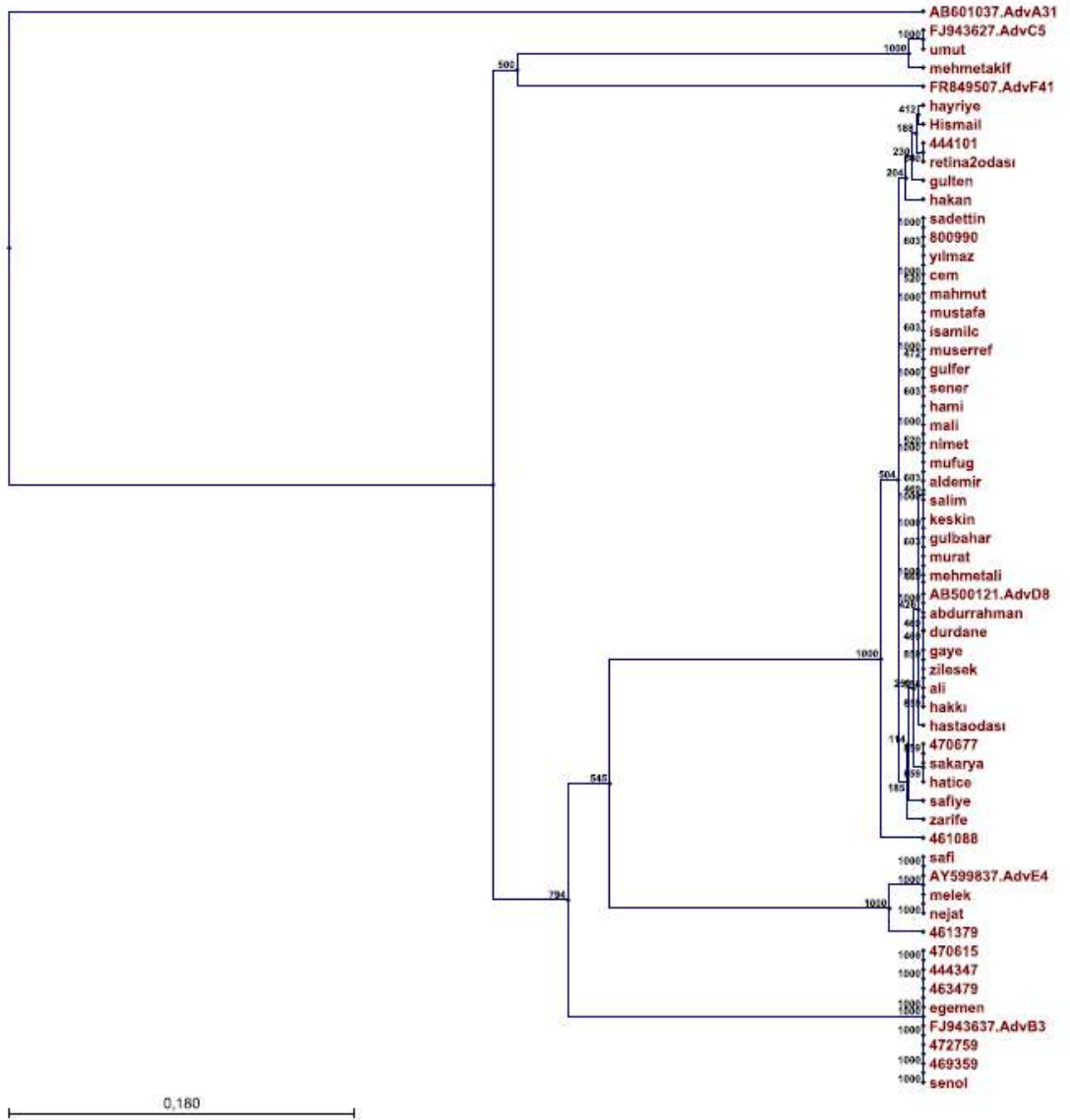
Üç ayrı merkezden sağlanan toplam 200 klinik materyelin 84'ünde PZR yöntemiyle adenovirüs DNA'sı pozitif saptanırken 116 örnek negatif bulundu. Pozitif saptanan örnekler dizileme reaksiyonuna alınarak serotiplendirme işlemi yapıldı. Buna göre 11'i tiplendirilemezken, 60'ı serotip 8 (56 göz örneği, 2 çevresel örnek, 2 solunum örneği), 7'si serotip 3 (solunum örneği), 4'ü serotip 4 (3 göz, 1 solunum örneği) ve 2'si serotip 5 (1 göz, 1 solunum örneği) olarak belirlendi (Tablo-4) (Figür-1)

Tablo-4: Adenovirüs serotip dağılımı

	Örnek Sayısı	Adenovirüs DNA (+)	Tiplendirilemeyen	Tip-3	Tip-4	Tip-5	Tip-8
CBÜ	88	20	9	2	7	1	1
KÜ	94	53	2	-	3	1	47
EÜ	18	18	-	5	1	-	12

Figür-1: Adenovirüs serotiplerinin filogenetik ağacı.

Filogenetik ağaç, CLC SequenceViewer 6.0.2'de UPGMA metodu ile 1000 bootstrap tekrar değerine göre yapıldı. Referans diziler GenBank'tan sağlanmıştır.



Referans diziler(AB 601037, FJ 943627, AB 500121, AY 599837, FJ 943637)

Araştırma grubunun demografik özellikleri incelendiğinde obez çocukların ortalama yaşı 11.98 ± 2.45 yıl olup, yaşları 7 ile 16 arasında değişmekteydi. Kontrol grubundaki obez olmayan çocukların yaşları ise 3 ile 17 arasında olup ortalama 9.83 ± 3.78 yıl idi (Tablo-5). Obez olan ve olmayan olguların yaşlara göre dağılımı istatistiksel olarak incelendiğinde obez grubun yaş ortalaması obez olmayan gruptan yüksek bulundu ($p=0.000$). Obez olan ve obez olmayan çocukların cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde ise obez çocukların 29'u kız (% 48.3), 31'i erkek (% 51.7); obez olmayan çocukların ise 31'i kız (%51.7), 29'u erkek (% 48.3) idi (Tablo-5). Obez ve obez olmayan grup arasında cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.071$)

Tablo-5: Çalışma grubunun demografik özellikleri

	Obez (n=60)	Obez olmayan (n=60)	P
Yaş (ortalama $\pm$ SS)	11.98 $\pm$ 2.45	9.83 $\pm$ 3.78	0.000
Kız (%)	48.3	51.7	0.071
Erkek (%)	51.7	48.3	

Obez grupta Ad-5, Ad-8 ve Ad-36 nötralizan antikor pozitifliği sırasıyla 17 (%28,3), 8 (%13,3) ve 16 (%26,6) olarak bulunurken, obez olmayan grupta 4 (%6,6), 5 (%8,3) ve 6'sında (%10.0) olarak bulundu. Obez grupta Ad-5 ve Ad-36 nötralizan antikor pozitifliği, obez olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı saptanırken (sırasıyla $p=0.02$, $p=0,018$); Ad-8 nötralizan antikor pozitifliği açısından iki grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.378$) (Tablo-6).

Tablo-6: Çalışma grubunun Ad-5, Ad-8, Ad-36 antikor pozitifliği

	Obez (n=60)	Obez olmayan (n=60)	
	%	%	P
Ad-5 antikor pozitif	28.3	6.6	0.002
Ad-8 antikor pozitif	13.3	8.3	0.378
Ad-36 antikor pozitif	26.6	10.0	0.018

Obez grupta adenovirüs spesifik IgA 2 örnekte (%3.3) pozitifken, obez olmayan grupta 3 örnekte (%5.0), adenovirüs spesifik IgM obez grupta 2 (%3.3), obez olmayan grupta 5 örnekte (%8.3), adenovirüs spesifik IgG ise obez grupta 60 (%100), obez olmayan grupta 56 örnekte (%93.3) pozitif olarak bulundu.

Çalışma grubunu oluşturan 60 obez ve 60 obez olmayan çocuğun adenovirüs spesifik IgA, IgM ve IgG pozitiflik sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında obez grupta adenovirüs IgG antikor prevalansı obez olmayan gruba göre yüksekti ($p=0.042$). Ancak adenovirüs IgA ve IgM antikor prevalansı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p=0.648$, $p=0.243$) (Tablo-7).

Tablo-7: Çalışma grubunun adenovirüs IgA, IgM, IgG pozitifliği

	Obez (n=60)	Obez olmayan (n=60)	
	%	%	P
Adenovirüs IgA	3.3	5.0	0.648
Adenovirüs IgM	3.3	8.3	0.243
Adenovirüs IgG	100.0	93.3	0.042

Obez ve obez olmayan grubun HDL, LDL, TG, kolesterol ve leptin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo:8'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel

analizde HDL düzeyi obez olanlarda anlamlı şekilde düşük bulundu (p=0.000). LDL, TG ve kolesterol düzeylerinde obez ve obez olmayan grup arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.083, p=0.268, p=0.500). Leptin düzeyinin kesme noktasını belirlemek amacıyla yapılan ROC analizine göre kesme noktası 119,8 alındığında testin duyarlılığı %87, seçiciliği %48 olarak belirlendi. Buna göre leptin düzeyi obez grupta obez olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p=0.000) (Tablo-8).

Tablo-8: Çalışma grubunun HDL, LDL, TG, kolesterol ve leptin düzeyleri

	Obez (n=60) ortalama $\pm$SS	Obez olmayan (n=60) ortalama $\pm$SS	P
HDL	44.6 $\pm$ 10.2	52.3 $\pm$ 12.9	0.000
LDL	93.2 $\pm$ 28.6	84.8 $\pm$ 23.9	0.083
TG	159.5 $\pm$ 34.7	155.7 $\pm$ 25.3	0.268
Kolesterol	107.1 $\pm$ 58.8	96.8 $\pm$ 42.0	0.500
Leptin	373.5 $\pm$ 262.3	206.1 $\pm$ 176	0.000

5.TARTIŞMA

Son yıllarda tüm dünyada obezitenin görülme sıklığı giderek artmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar yaş, cinsiyet gibi demografik faktörlerle, eğitim düzeyi, medeni durum gibi sosyo-kültürel faktörler yanında biyolojik faktörlerin ve beslenme alışkanlıklarının, sigara ve alkol tüketimi ile fiziksel aktivite azlığı gibi yaşam biçimi faktörlerinin de obeziteden sorumlu olduğunu göstermektedir (3). Obezite, çocuk ve adölesanların %25-30'unu etkileyen önemli bir beslenme problemidir. Çocukluk çağı obezitesi özellikle gelişmiş ülkelerde olmakla beraber bütün dünyada artan bir prevalansa sahiptir (4). Obez çocuklar uzun dönemde, adipositeye ikincil gelişen artmış morbidite ve mortalite riski altındadırlar (104). Çocukluk çağı obezitesindeki artışa paralel olarak tip 2 diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon gibi daha çok erişkinlerde görülen kronik hastalıklar, çocukluk çağında da önemli bir sorun haline gelmektedir (105). DSÖ, 1998 yılında obeziteyi global bir epidemi olarak nitelemiş ve bir halk sağlığı sorunu olduğunu vurgulamıştır (2).

Obezite günümüzde erişkinlerin olduğu kadar çocuk ve adölesanların da önemli bir sağlık sorunudur. Çocukluk çağı obezitesi, birçok kronik hastalığın erken dönemde ortaya çıkması, çocukluk çağında obez olanların %50'sinin erişkin döneme de obez olarak girmesi, erişkin dönemde yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olmalarının yanı sıra çocuk üzerinde bazı psikolojik hasarlar da oluşturmaktadır. Çocuklarda kendini sevmeme, yalnızlık, sinirlilikle beraber sigara ve alkol gibi yüksek riskli davranışlar da gözlenmektedir (17).

Çocukluk çağında ve takip eden erişkin dönemde neden olduğu sorunlar açısından çocukluk çağı obezitesi çok önemlidir. Bu nedenle biz de araştırmamızda çalışma grubunu çocuklardan oluşturduk.

Günümüzde obeziteye neden olduğu düşünülen sayısız faktör vardır. Ancak obezitenin bulaşıcı hastalıklara benzer şekilde hızlı yayılımı göz önüne alındığında bu yayılımın infeksiyöz nedenlerle, özellikle de virüslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (20).

Bazı çalışmalarda adenovirüs serotiplerinin obezitede rol oynadığına dair yapılan araştırmalarda araştırmacıların insanlarda bu virüslerle daha geniş kapsamlı çalışılması gerektiğini vurgulamaları sebebiyle biz de araştırmamızda çocuk obezitesinde adenovirüslerin rolünü belirlemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda çalışma iki farklı şekilde tasarlandı. Birinci aşamada üç ayrı merkezden sağlanan 200 örnekte adenovirüs serotipleri belirlendi, bu serotiplerden 5 ve 8 mikronötralizasyon testinde kullanıldı. İkinci aşamada ise Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniğinden obez ($n=60$, $VKI \geq 95$) ve obez olmayan ($n=60$, $VKI \leq 85$) 120 çocuğun serumunda adenovirüs spesifik IgG, IgA, IgM, HDL, LDL, TG, Kolesterol ve leptin düzeyleri ölçüldü; Ad-5, Ad-8, Ad-36 serotip spesifik antikorları mikronötralizasyon yöntemiyle araştırıldı.

Günümüze kadar ülkemizde adenovirüs infeksiyonlarının prevalansını ve serotip dağılımını bildiren kısıtlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

2007 yılında Ankara'da yaptıkları bir çalışmada Bodur ve ark.ları (106) solunum yolu infeksiyonu şikayetleri olan ilköğretim çağı öğrencilerinden aldıkları boğaz sürüntü örneklerinde PZR yöntemi ile adenovirüs pozitifliğini araştırmışlar. Çalışmada %2.2 (11/500) oranında adenovirüs DNA'sı pozitif saptanmış ve tümünün E alt grubuna (tip-4) ait olduğu belirlenmiştir.

Aslan ve ark.ları (107) 1997-1998 yılları arasında 45 üst solunum yolu infeksiyonlu çocukta shell vial ve klasik kültür yöntemiyle adenovirüs pozitifliğini %6 bulurlarken, 50 alt solunum yolu infeksiyonlu çocukta shell vial yöntemiyle bu oranı %10 şeklinde bulmuşlardır.

Bayraktar ve ark.larının (108) ise akut gastroenteritli çocuklarda yaptıkları çalışmada 1358 akut gastroenteritli çocuğun gaita örneklerinde rotavirüs, adenovirüs 40-41 immunokromatografik test kullanarak araştırmışlar ve %23.7 rotavirüs, %1.5 adenovirüs 40-41 pozitifliği saptanmışlardır.

Yine Akıncı ve ark.larının (109) aynı yöntemle 2004-2005 yılları arasında akut gastroenteritli çocuklarda adenovirüs ve rotavirüs araştırdıkları çalışmada 307 gaita örneğinde %14.9 adenovirüs, %13.7 rotavirüs ve %8.2 hem adenovirüs hem de rotavirüs saptanmıştır.

Erdin ve ark.larının (110) 2006-2010 yılları arasında İzmir'de yaptıkları çalışmada 213 keratokonjunktivitli hastada PZR ile adenovirüs DNA'sı pozitif saptanmış ve bu örneklerden 101 tanesi randomize olarak seçilerek genotiplendirilmiştir. Çalışmada 3, 4, 8, 11, 19, 22 ve 37 olmak üzere 7 adenovirüs genotipi saptanmış; 101 örneğin %66.3'ü tip-8, %24.6'sı tip-4 iken diğer 5 genotip örnek %8.9 olarak belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızın ilk basamağını oluşturan adenovirüs serotiplendirme çalışmasında 3 ayrı merkezden sağlanan toplam 200 klinik materyelin 84'ünde PZR yöntemiyle adenovirüs DNA'sı pozitif saptanırken 116 örnek negatif bulmuştur. Pozitif saptanan örnekler dizileme reaksiyonuna alınarak serotiplendirme işlemi yapılmıştır. Buna göre 11'i tiplendirilemezken, 60'ı serotip 8 (56 göz örneği, 2 çevresel örnek, 2 solunum örneği), 7'si serotip 3 (solunum örneği), 4'ü serotip 4 (3 göz, 1 solunum örneği) ve 2'si serotip 5 (1 göz, 1 solunum örneği) olarak belirlenmiştir.

Ülkemiz literatürü araştırma bulgularımızla birlikte değerlendirildiğinde genellikle yaygın serotiplerin 3, 4, 5, 8, 11, 19, 22, 37, 40 ve 41 şeklinde olduğu gözlenmektedir.

Yaptığımız serotip çalışmasının bir diğer amacı da elde ettiğimiz serotipleri çocuk obezitesindeki rollerini araştırmaktır. Bu serotipler, daha önce yapılan bir hayvan çalışmasında obeziteyle ilişkisi belirlenen ancak hiçbir insan çalışması yapılmamış Ad-5, sınırlı sayıda hayvan ve insan çalışmalarında obeziteye sebep olduğu ortaya konmuş Ad-36 (ATCC VR-1610) çoğaltılarak mikronötralizasyontestinde kullanıldı. Kontrol suşu olarak da obezite çalışmalarında kullanılmamış Ad-8 serotipini, mikronötralizasyon deneylerinde kullanmak amacıyla Hep-2 hücre kültür hattında çoğalttık.

Araştırma grubu oluşturan obez ve obez olmayan grubun demografik özellikleri incelendiğinde cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p=0,071$) obez grubun yaş ortalaması obez olmayan gruptan yüksek bulundu ($p=0,000$). Obezite her yaşta görülebilmekle beraber obezitenin gelişiminde üç dönem bulunmaktadır. Bunlar doğum öncesi, 5-7 yaş ve ergenlik dönemidir. Biz hastalarımızı çocuk endokrin polikliniğine başvuran obez çocuklardan oluşturduğumuz için obezitenin ortaya çıkması ve polikliniğe başvurma sürecinde geçen zaman da düşünülerek obez çocukların yaş ortalamalarının obez olmayanlara göre yüksek çıkması beklenen bir bulguydu. Benzer olarak Atkinson'nın 502 gönüllüde yaptığı çalışmada Ad-36 antikor pozitif ve negatiflerin ortalama yaşları benzerdi (41.7'ye karşı 40.7, $p=0.38$) ve bu da yaşın Ad-36 enfeksiyonu için önemli rol oynamadığını göstermekteydi (91).

Yaptığımız çalışmada adenovirüs seroprevalansı obez olanlarda %100, olmayanlarda %93.3 bulunmuştur. Obez grupta adenovirüs IgG antikor prevalansı obez olmayan gruba göre yüksekti ($p=0,042$). Ancak adenovirüs IgA ve IgM antikor prevalansı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p=0,648$, $p=0,243$). Bizim bulgularımız 3-17 yaş grubu arasında Manisa bölgesindeki çocukların büyük çoğunluğunun adenovirüslerle karşılaştığını göstermektedir. Söyletir ve ark.ları (111) 0-15 yaş grubu 206 çocuktan alınan serum örneklerinde kompleman birleşme testi kullanılarak yaptıkları çalışmada adenovirüs özgül antikor oranını %4.85 olarak bulmuşlardır. Bu farklılığın temelinde kullanılan yöntemlerin ve bölgesel değişikliklerin etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Dhurandhar ve ark.larının ilk çalışmalarından bu yana yapılan hayvan araştırmalarında Ad-36 inokülasyonunun tavuklarda, farelerde ve primatlarda visseral adipoz dokuda artışa sebep olduğu değişik araştırmacı grupları tarafından da gösterilmiştir. Ancak insan inokülasyonları etik açıdan mümkün olmadığı için Ad-36'nın insanlarda obeziteye sebep olduğu kanıtlanamamıştır (86, 87, 88, 89, 90, 92).

Atkinson ve ark.ları (91) 89 ikiz çifti üzerinde yaptıkları çalışmada Ad-36, Ad-2, Ad-31 ve Ad-37 antikor pozitifliği yönünden taramışlar ve diğer

serotiplerden farklı olarak Ad-36 antikor pozitif ikizlerde belirgin olarak yüksek BMI ve vücut yağ yüzdesi saptamışlardır. İkizlerin aynı çevresel faktörlere maruziyeti ve benzer demografik özellikleri göz önüne alındığında bu çalışma Ad-36'nın insanlarda adipositeyi arttırdığı hipotezine büyük destek sağlamaktadır.

Bizim yaptığımız çalışmada obez olan ve olmayan grup Ad-5, Ad-8 ve Ad-36 mikronötralizasyon testiyle antikor pozitifliği yönünden değerlendirildi. Obez grupta Ad-5 ve Ad-36 nötralizan antikor pozitifliği, obez olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0.02$, $p=0.018$), Ad-8 nötralizan antikor pozitifliği açısından iki grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.378$). Tüm bu sonuçlar kapsamında Ad-36 antikor pozitifliği literatüre uygun şekilde obez grupta obez olmayan gruba göre yüksek bulundu. Araştırmamız Türkiye'de Ad-36 ile yapılan ilk çalışma olup Ad-36'nın çocuk obezitesi ile ilişkisini ortaya koyan dünyadaki ender araştırmalardan da birisidir. Günümüze kadar Ad-5'in sadece bir hayvan çalışmasında visseral adipoz dokuyu arttırdığı gösterilmiş ve Ad-5'in insan araştırmalarında kullanılması önerilmekteydi (93). Ad-5'in çocuk obezitesiyle ilişkisini araştırdığımız çalışmamız dünyada bu konuyla ilgili yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Buna göre Ad-5 antikor pozitifliği obez grupta obez olmayan gruba göre yüksek bulunmuştur. Bu da bizlere Ad-5'in de çocuk obezitesiyle ilişkisi olduğunu göstermekteydi. Ad-8 antikor pozitifliği ise obez olan ve olmayan grupta benzerdi. Bu nedenle Ad-8 obezite ile ilişkilendirilemedi.

Atkinson ve ark.larının (91) 502 gönüllüde yaptığı Ad-36 antikor taramasında Ad-36 antikor (+) olanların BMI'leri Ad-36(-) olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ad-36 antikor prevalansının obez bireylerde obez olmayanlara göre 3 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. Obez insanların Ad-36 enfeksiyonuna daha duyarlı olabileceği ihtimali düşünülmüş, ancak aynı çalışmada Ad-2 ve Ad-31 için antikor pozitifliği de taranmış olup obez olan ve olmayanlarda benzer antikor prevalansı bulunmuştur. Böylece obez insanların enfeksiyona daha duyarlı olmadığını kanıtlamışlardır.

Literatürde obez insanların immün fonksiyonlarında bozulma olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Hepatit B aşısı olan obez insanlarda azalmış antikor prevalansı saptanmış ve bu da viral antijene immün cevabın azaldığını akla getirmiştir (112). Bu bulgu obez insanların adenovirüs ile karşılaştıklarında obez olmayanlara göre antikor üretmeye daha az meyilli olduklarını düşündürse de, bizim yaptığımız çalışmada Ad-5 antikor pozitifliği obez grupta obez olmayan gruba göre 4 kat fazla bulunurken, Ad-36'da yaklaşık 3 kat fazla bulunmuştur.

Adenovirüslere bağlı obezite olgularında lipit profilleri de değişkenlik göstermektedir. Nitekim Dhuranhard ve ark.larının (88) tavuk ve farelerde yaptıkları çalışmalarda Ad-36 ile inoküle grubun serum TG ve kolesterol düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Atkinson ve ark.larının (91) 502 gönüllüde ve 89 ikiz çiftinde yaptığı çalışmalarda aynı zamanda serum kolesterol ve TG düzeyleri de incelenmiştir. 502 gönüllüde Ad-36 antikor pozitif olanların serum kolesterol ve TG düzeyleri, Ad-36 antikor negatifliği olanlardan anlamlı şekilde düşük bulunurken, yapılan ikiz çalışmasında Ad-36 antikor pozitif ve negatifler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Aynı çalışmalarda Ad-2, Ad-31 ve Ad-37 antikor pozitif ve negatiflerin serum kolesterol ve TG düzeyleri değerlendirilmiş, ancak sadece 502 gönüllüde yapılan çalışmada Ad-2 antikor pozitif obez olmayanların serum kolesterolünün anlamlı olarak düşük bulunması dışında herhangi bir anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Biz de yaptığımız çalışmada obez olan ve olmayan çocukların serum kolesterol, TG, HDL, LDL ve leptin düzeylerini ölçtük. Yapılan istatistiksel analizde obez olan ve olmayan grubun kolesterol, TG, HDL, LDL ve leptin düzeylerini karşılaştırdığımızda HDL düzeyi obez olanlarda anlamlı şekilde düşük bulunurken ($p=0.000$) LDL, TG ve kolesterol düzeylerinde obez olan ve olmayan grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.083$, $p=0.268$, $p=0.500$). Leptin düzeyi ise obez grupta obez olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,000$). HDL düzeyi düşüklüğü ve leptin düzeyi yüksekliği obezitede beklenen bir bulgudur. Ancak LDL, TG ve kolesterol düzeyleri arasında anlamlı fark olmamasını çalışma grubumuz çocuk hastalardan oluştuğu için adenovirüslerle ne zaman infekte

oldukları bilinmediği ve belki de serum profilinde değişikliğin henüz oluşturulmadığı şeklinde yorumlayabiliriz. Benzer şekilde Atkinson'ın yaptığı ikiz çalışmasında da yaş ortalaması düşük olup, serum kolesterol ve TG düzeyleri açısından Ad-36 (+) ve negatifler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'inde Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları [National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)]'na göre 1976–1980 ve 1999–2002 yılları arasında obez insanların sayısı yaklaşık iki katına çıkmış ve bu yükseliş ivmesi son yıllarda daha da artmıştır. Obezite sadece ABD'de değil, aynı zamanda Avrupa'da da önemli bir sorun haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1998 yılında obeziteyi global bir epidemi olarak nitelemiş ve bir halk sağlığı sorunu olduğunu vurgulamıştır.

Obezite, çocuk ve adolesanların %25-30'unu etkileyen önemli bir beslenme problemidir. Çocukluk çağı obezitesi özellikle gelişmiş ülkelerde olmakla beraber bütün dünyada artan bir prevalansa sahiptir. Obeziteye bağlı problemlerin yanı sıra çocukluk çağında obez olanlarda erişkin dönemde morbidite ve mortalitenin artması, adolesan döneme obez girenlerin %50'sinin erişkin dönemde obez olması ve çoğu kez aileler ve hekimler tarafından tedavi edilmesi gereken bir hastalık olarak görülmemesi açısından önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Obeziteye neden olduğu düşünülen en önemli faktörler arasında genetik, çevresel, nöronal ve endokrin faktörler gösterilmektedir. Ancak sorunun bulaşıcı hastalıklara benzer şekilde hızlı bir yayılma göstermesi obezitenin etiolojisinde patojen etkenlerin rol alıp almadığı sorusunu gündeme getirmiş ve günümüze dek üç tanesi insan virüsü (Adenovirüs tip 5 (Ad-5), Ad-36, Ad-37) ve beş tanesi hayvan virüsü (köpek gençlik hastalığı virüsü, Rous-associated virüs tip 7, SMAM-1, Scrapie ajanı, Borna hastalığı virüsü) olmak üzere toplam sekiz virüsün obeziteyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Ülkemizde adenovirüslerle ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır ve obezite ile ilişkilerini araştıran herhangi bir çalışma günümüze kadar yapılmamıştır. Çalışmamız sonucunda Ad-5 ve Ad-36 serotiplerinin çocuklardaki obeziteyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Araştırmamız Ad-36'nın insan obezitesiyle ilişkisine işaret eden ülkemizde yapılmış ilk araştırma özelliğini taşıırken, Ad-5'in insan obezitesiyle ilişkisini gösteren dünyadaki ilk araştırmadır. Sonuç olarak tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda araştırmamız sonuçlarının ülkemiz ve dünya literatürüne önemli katkılarının olabileceğini düşünmekteyiz.

Adenovirüslerle olan obezitede birçok mekanizmanın rol aldığı düşünülse de mekanizmaları açıklayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde çok büyük bir sağlık sorunu olan obeziteyi engellemek en önemli sağlık politikası haline gelmeli, ülkemizde adenovirüslerin obeziteyle ilişkisini araştıran çalışmaların sayısı artmalı ve belli bir bilgi birikimine ulaşıldıktan sonra aşı veya tedavi seçenekleri tartışılmalıdır.

7.KAYNAKLAR

1. Tuncer P, Yeşilbağ K. Obezite olgularında viral etyoloji. İnfeksiyon Dergisi 2008; 22 (4): 241-249
2. World Health Organization: Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, World Health Organ Tech Rep Ser. 2000; 894: 1- 253.
- 3.Türkiye obezite (şişmanlık) ile mücadele ve kontrol programı (2010-2014), Ankara 2010.
4. Klish WJ. Childhood obesity, pathophysiology and treatment. Acta Paediatr Jpn 1995; 37: 1-6.
5. Donohoue PA. Obesity. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson Textbook of Pediatrics 17 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004: 173- 177.
6. Akbulut G, Özmen M, Besler T. Çağın Hastalığı Obezite, TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi. Ek s. 2007; 2-15.

7. Martorell R, Kettle K, Hughes ML, Grummer-Stawn ML. Overweight and obesity in preschool children from developing countries. *Int J Obes* 2000; 24:959-67.
8. Lustig HR, Preeyasombat C, Velasquez-Mieyer PA. Childhood obesity In: *Pediatric Endocrinology* Pescovitz H.O, Eugster A.E (ed), Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004; 682–715.
9. Ogden C, Carroll M. Division of health and nutrition examination surveys prevalence of obesity among children and adolescents: United States, Trends 1963–1965 Through 2007–2008 June 2010
10. The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response, Ed. Francesco Branca, Haik Nikogosian ve Tim Lobstein, WHO, Denmark, 2007.
11. Krassas GE, Tsametis C, Baleki V, et al. Balkan Group for the study of obesity. Prevalence of overweight and obesity among children and adolescents in Thessaloniki- Greece and Kayseri-Turkey. *Pediatr Endoc Rev* 2004;1 Suppl.3:460-464.
12. Sur H, Kolotourou M, Dimitriou M, et al. Biochemical and behavioral indices related to BMI in schoolchildren in urban Turkey. *Prev Med* 2005;41(2):614-621.
13. Szek H, Arı Z ve Uyanık BS. Muğla'da yaşıayan 6-15 yaşı okul çocuklarında kilo fazlalığı ve obezite prevalansı. *Türk Biyokimya Dergisi* 2005; 30(4):290-295.
14. Özgüven I, Ersoy B, Aykan AA, Erbay PD. Evaluation of Nutritional Status in Turkish Adolescents as Related to Gender and Socioeconomic Status *J Clin Res Ped Endo* 2010;2(3):111-116.

15. Alemzadeh R, Lifshitz F. Childhood obesity In: Pediatric Endocrinology Lifshitz F. (ed), 4th ed, New York: Marcel Dekker, 2003; 823–858.
16. Styne DM. Childhood and adolescent obesity. Prevalence and significance. *Pediatr Clin North Am.* 2001 Aug;48(4):823-54.
17. Gürel FS, İnan G. Çocukluk çağı obezitesi tanı yöntemleri, prevalansı ve etyolojisi. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2001; 2(3):39– 46.
18. Himes JH, Dietz WH. Guidelines for overweight in adolescent preventive services: recommendations from an expert committee. The Expert Committee on Clinical Guidelines for Overweight in adolescent Preventive Services. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:307-16.
19. Garnett SP, Baur LA, Srinivasan S, et al. Body mass index and waist circumference in midchildhood and adverse cardiovascular disease risk clustering in adolescence. *Am J Clin Nutr* 2007 Sep;86(3): 549-55.
20. Atkinson RL, Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82(10):1192-1198.
21. Granoff A, Webster RG. Paramyxoviridae. In: *Encyclopedia of Virology*, Vol III. 2nd ed. London: Academic Press, 1999:1565-8.
22. Vasilakopoulou A, le Roux CW. Could a virus contribute to weight gain? *Int J Obes* 2007;31:1350-6.

23. Bernard A, Cohen R, Khuth ST, et al. Alteration of the leptin network in late morbid obesity induced in mice by brain infection with canine distemper virus. *J Virol* 1999; 73(9):7317–27.
24. Carrter JK, Ow CL, Smith RE. Rous associated virus type 7 induces a syndrome in chickens characterized by stunting and obesity. *Infect Immun* 1983; 39(1):410-422.
25. Pasarica M, Dhurandhar NV. Infectobesity: obesity of infectious origin. *Advances in Food and Nutrition Research* 2007; 52:62–102.
26. Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science*. 1983; 220(4604):1401-1403.
27. Gosztonyi G, Ludwig H. Borna disease neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 190:39-73.
28. Herden C, Herzog S, Richt JA, et al. Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol* 2000; 10(1):39-48.
29. Poser CM. Notes on the history of the prion diseases part II. *Clin Neurol Neurosurg* 2002; 104:77-86.
30. Kim YS, Carp RI, Callahan SM, Wisniewski HM. Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 189(1):21-27.
31. Ajinkya SM. Final technical report, ICAR 1985. Bombay, India: Red and Blue Cross Publishing; 1985: 13-43.

32. Dhurandhar NV, Kulkarni P, Ajinkya SM, Sherikar A. Effect of adenovirus infection on adiposity in chicken. *Vet Microbiol* 1992; 31: 101-7.
33. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM, Sherikar AA, Atkinson RL. Association of adenovirus infection with human obesity. *Obesity Research* 1997; 5(5):464–9.
34. Rowe WP, Heubner R, Gilmore L, Parrot R, Ward T. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84: 570-573.
35. Hilleman MR, Werner J. Recovery of a new agent from patients with acut respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 85: 183-188.
36. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M editörler. *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri. 2008; sf: 1696-1700.
37. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Çeviri Editörü: Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji. Atlas Kitapçılık. Ankara. 2009; 1589-1600.
38. <http://en.wikipedia.org/wiki/Adenoviridae>, 2011.
39. Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003; 84:2895-2908.
40. Serter D. Virüs, riketsiya ve klamidya hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevleri 1997; 116-123.

41. Tuncer S, Ustaelebi Œ. Temel ve Klinik Mikrİbiyoloji 1. Baskı GüneŒ Kitabevi Ankara 1999; 807-813.
42. Gammet CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of spespecies C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. J Viral 2002; 76:10608-10616.
- 43.Landry ML, Fong CK, Nedderman K, et al. Disseminated adenovirus infection in an immunocompromised host. Pitfalls in diagnosis. Am J Med 1987; 83:555-559.
44. Hammond GW, Hazelton PR, Chuang I, Klisko B. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. J Clin Mikrobiol 1981; 14:210-221.
45. Landry ML, Ferguson D. Simulfluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimans by immunofluorescence staining. J Clin Mikrobiol 2000; 38:708-711.
46. Stout CM, Murphy D, Lawrence S, Julian S. Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viral infections. J Clin Microbiol 1989; 27:448-452.
47. Herrmann JE, Perron DM, Blacklow NR. Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. J Infect Dis 1987; 155:1167-1171.
48. August MJ, Warlord AL. Evaluation of a commercial monoclonal antibody for detection of adenovirus antijen. J Clin Mikrobiol 1987; 25: 2233-2235.
49. Glaves CA, Militoni J, Ashley RL. An enzyme immunoassay for the direct detection of adenİvirüs in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 17:57-59.

50. Fujimoto TT, Okafuji T, Ito M, et al. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5489-5492.
51. Grandien M, Pettersson CA, Svensson L, Uhnöo I. Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *J Med Virol* 1987; 23: 311-316.
52. Moosai RB, Carter MJ, Madeley CR. Rapid detection of enteric adenovirus and rotavirus: a simple method using polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Pathol* 1984; 37:1404-1408.
53. Kidd AH, Harley EH, Erasmus MJ. Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1985; 22:934-939.
54. Matsuse T, Matsui H, Shu CY, et al. Adenovirus pulmonary infections identified by PCR and in situ hybridization in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol* 1994; 47:973-977.
55. Claas EC, Schilham MW, Brouwer CS, et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipient. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1738-1744.
56. Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, et al. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus infected individuals. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3323-3326.
57. Heim A, Ebnet C, Harste G, Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003; 77:6562-6566.

58. Vabret A, Gouarin S, Joannes M, et al. Development of a PCR and hybridization based assay for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2004; 31:116-122.
59. Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiblex reverse transcription PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3149-3154.
60. Pehler HK, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplax, a multiplex PCR enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2004; 26: 1445-1447.
61. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two reaction real time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005; 36:3323-3326.
62. Leruez VM, Minard V, Lacaille F, et al. Real time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38:45-52.
63. Smith CD, Craft DW, Shiromoto RS, Yan PO. Alternative cell line for virus isolation. *J Clin Microbiol* 1986; 24:265-268.
64. Takiff HE, Straus SE, Garon CF. Propagation and in vitro studies of previously noncultivable enteric adenoviruses in 293 cell. *Lancet* ii: 1981; 832-834.
65. Lipson SM, Poshni IA, Ashley RL, et al. Presumptive identification of common adenovirus serotypes by the development of differential

cytopathic effects in the human lung carcinoma (A549) cell culture. FEMS Microbiol Lett 1993; 113: 175-182.

66. Espy MJ, Hierholzer JC, Smith TF. The effect of santrifugation on the rapid detection of adenovirus in shell vials. Am J Clin Pathol 1987 ; 88:358-360.

67. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. J Clin Mikrobiol 1992; 30:1505-1508.

68. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by ageneral PCR combined with restriction endonuclease analysis. J Clin Mikrobiol 2001; 39:498-505.

69. Julkunen I, Lehtomaki K, Hovi T. Immunoglobulin class spesifik serological responses to adenovirus in respratoriy infections of young adult men. J Clin Microbiol 1986; 24:112-115.

70. Meurman O, Ruuskanen O, Sarkkinen H. Immunoassay diagnosis of adenovirus infections in children. J Clin Microbiol 1983; 18:1190-1195.

71. Videla C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized childeren from Argentina. Clin Diagn Virol 1998; 10:17-23.

72. Fernanda C, Philip L, Dean D, et al. Health care transmission of a newly emergent adenovirus serotype in health care personnelat a military hospital in Texas. J Infect Dis 2009; 200 (11):1759-1765.

73. Inagawa WS, Tanaka K, Uchio E, et al. Genome typing of adenovirus type 34 isolated in two cases of conjunctivitis in Sapporo, Japan. *J Clin Microbiol*, 2001; 39:4187-4189.
74. Evelyn M, Sharon L, Ludwig J, et al. Reemergence of adenovirus type 4 acute respiratory disease in military trainees: Report of an outbreak during a lapse in vaccination. *J Infec Dis* 1999;179:1531–3.
75. Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, et al. New genome type of adenovirus serotype 4 caused nasocomia infections associated with epidemic conjunctivitis in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3644-8.
76. Uchio E, Ishiko H, Aoki K, Ohno S. Adenovirus detected by polymerase chain reaction in multidose eyedrop bottles used by patients with adenoviral keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2002; 134(4):618-9.
77. Jin XH, Ishiko H, Nguyen TH, et al. Epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnam. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(6):1064-6.
78. Suat Biçer S, Gülhan Tunca G, Koncay B, ve ark. Çocuklarda adenovirüs gastroenteriti olgularının sıklığı. *Bakırköy Tıp Dergisi* 2009;5:6-10.
79. Guarner J, Bojorge B, Lopez E, et al. Intestinal intussusception associated with adenovirus infection in Mexican children. *Am J Clin Pathol*. 2003 Dec;120(6):845-50.
80. Hierholzer J.C. Adenoviruses in the immuncompromised host. *Clin Mikrobiol Rev*. 1992 (5): 262-274.
81. Chakrabati S, Muligan DW, Moss PA, Mautner V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients; recent developments in

understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leukemia Lymphoma* 2004; 45:873-885.

82. Echavarria MS, Ray SC, Ambinder R, Dumler JS, Charache P. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J Clin Microbiol* 1999; 37:686-689.

83. Swenson P, Lowens S, Connie L, et al. Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol.* 1995; 2728–2731.

84. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1995; 53(1):25-36.

85. Shirali GS, Ni J, Chinnock RE, et al. Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2001; 344:1498-1503.

86. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, et al. Transmissibility of adenovirus induced adiposity in a chicken model. *Int J. Obes* 2001; 25(7):990–6.

87. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, et al. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes* 2000; 24(8):989–96.

88. Pasarica M, Shin CW, Yu M. Human Adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Int J Obesity* 2006; 14:1905–13.

89. Kapila M, Khosla P, Dhurandhar NV. Novel short term effects of Ad-36 on hamster lipoproteins. *Int J Obes* 2004; 28(12):1521-7.

90. Dhurandhar NV, Whigham LD, Abbott DH. Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *J Nutr* 2002; 132:3155-60.
91. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB. Human Ad-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes* 2005; 29(3):281-286.
92. Whigham LD, Israel BA, Atkinson RL. Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 190-196.
93. So PW, Herlihy AH, Bell JD. Adiposity induced by adenovirus 5 inoculation. *Int J Obes* 2005; 29(6):603-606.
94. Ginneken VV, Sitnyakowsky L, Jeffery JE. Infectobesity: viral infections may be a cause of obesity. *Medical hypotheses* 2009;383-388.
95. Argiles JM, Lopez J, Almendro V, et al. Cross talk between skeletal muscle and adipose tissue: A link with obesity? *Med Res Rev* 2005; 25(1):49-65.
96. Frühbeck G, Gomez J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: A model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Phys Endocrin Met* 2001; 280(6):827-847.
97. Pasarica M, Loiler S, Dhurandhar NV . Acute effect of infection by adipogenic human adenovirus Ad36. *Arch Virol* 2008; 153(11):2097–2102.

98. Salehian B, Forman SJ, Kandeel FR, et al. Adenovirus 36 DNA in adipose tissue of patient with unusual visceral obesity. *Am Infect Dis* 2010; 16-17.
99. Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, et al. A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obes Res* 2004; 12(5):770-777.
100. Vangipuram SD, Yu M, Tian J. Adipogenic human adenovirus 36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int J Obes* 2007; 31(1):87-96.
101. Rogers PM, Fusinski KA, Rathod, MA. Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int J Obes* 2008; 32:387-406.
102. Rathod M, Vangipuram SD, Krishnan B, Heydari AR, Holland TC, Dhurandhar NV. Viral mRNA expression but not DNA replication is required for lipogenic effect of human adenovirus Ad-36 in preadipocytes. *Int J Obes* 2007; 31(1):78-86.
103. Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol* 2006; 151(8): 1587–1602.
104. Artz E, Haqq A, Freemark M. Hormonal and metabolic consequences of childhood obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34(3):643-58.
105. Maffeis C. Aetiology of overweight and obesity in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2000; 159(1):35-44.
106. Bodur E, Yapar M, Şener K. ve ark. Üst solunum yolu enfeksiyonu yakınmaları olan ilköğretim çağı çocuklarında PZR

yöntemi kullanılarak adenovirüs araştırılması Gülhane Tıp Dergisi 2009; 51:162-167.

107. Aslan SS, Yılmaz G. Akut solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda adenovirus infeksiyonu insidansının saptanması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31:242-244.

108. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirüs saptanması. Klimik Dergisi 2010; 23(1):15-7.

109. Akıncı N, Ercan T, Yalman N. ve ark. Akut gastroenteritli çocuklarda adenovirüs ve rotavirüs. J Pediatr Inf 2007; 1:98-101.

110. Erdin B, Sayiner A, Pas S. Keratokonjonktivit yapan adenovirüslerin genotip prevalansı. 4. Ulusal viroloji kongresi. İstanbul, 2011, s:146.

111. Güner Söyletir G, Us D, Çerikcioğlu N, Babacan F. Çocuklarda adenovirüs grup kompleman birleşmesi antikor dağılımı. Mikrobiyol bul 1990; 24:16-19.

112. Simo J, Ganuza M, Millan P, Fernandez M. Hepatitis B vaccine immunoresponse in adolescents: a revaccination proposal after primary vaccination. Vaccine 1996; 14: 103–106.