

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'UN FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN MİDYE
VE KARİDESLERDE ROTAVİRUS, ADENOVİRUS VE ASTROVİRUS
VARLIĞININ REAL-TIME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Farouk GHALYOUN

Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı
Gıda Güvenliği Programı

Ekim 2017

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'UN FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN MİDYE
VE KARİDESLERDE ROTAVİRUS, ADENOVİRUS VE ASTROVİRUS
VARLIĞININ REAL-TIME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farouk GHALYOUN
(Y1513.210001)

Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı
Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ayla ÜNVER ALÇAY

Ekim 2017



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı **Y1513.210001** numaralı öğrencisi **Farouk GHALYOUN**'ın "**İSTANBULUN FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN MİDYE VE KARİDESLERDE ROTAVİRUS, ADENOVİRÜS VE ASTRAVİRÜS VARLIĞININ REAL-TİME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 12.09.2017 tarih ve 2017/20 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **ayrılığı** ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak **kabul** edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi : 12/10/2017

1) **Tez Danışmanı:** Yrd. Doç. Dr. Ayla ÜNVER ALÇAY

2) **Jüri Üyesi :** Prof. Dr. Candan VARLIK

3) **Jüri Üyesi :** Prof. Dr. Serkan İKİZ

.....
.....
.....

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İstanbul’un farklı yerlerinden toplanan midye ve karideslerde Rotavirus, Adenovirus ve Astrovirus varlığının Real-time PCR yöntemi ile araştırılması” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. Ekim.2017

Farouk GHALYOUN







Sevgili aileme ve kardeşlerime...



ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmamın hazırlanması, düzenlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çok önemli bilimsel ve manevi desteğini sınırsız bir şekilde sunulan, çalışmamın boyunca her seferinde doğru kararların almasında bana destek veren, değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayla ÜNVER ALÇAY'a; Eğitim hayatımın boyunca her zaman yanımda olan sevgili babam'a, annem'e, kardeşlerime ve değerli eşim Rajaa'a;

Tezin pratik kısmının her aşamasında emeği geçen İntertek Test Hizmetleri A.Ş. firması, özellikle bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Ahu ÜNER AKBALIK, Sayın Gülfem GÜZEL ve çalıştığım laboratuvarıda yardımlarını esirgemeyen bütün diğer arkadaşlarıma en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2017

Farouk GHALYOUN
Gıda Güvenliği



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enterik Viruslar.....	3
2.1.1. Rotavirus.....	6
2.1.2. Adenovirus.....	10
2.1.3. Astrovirus.....	11
2.1.4. Norovirus.....	14
2.1.5. Hepatit A virusu.....	15
2.1.6. Poliovirus.....	16
2.2. Virusların Bulaşma Yolları.....	16
2.2.1. Atık su ve insan dışkısı.....	17
2.2.2. Enfekte olan gıda çalışanları.....	18
2.2.3. Zoonotik bulaşma.....	19
2.2.4. Kabuklular, özel virus araçları.....	19
2.3. Gıdalarda Virusların Tespit Yöntemleri.....	20
2.3.1. Virus elüsyonu ve konsantre edilmesi.....	23
2.3.2. Moleküler saptama yöntemleri.....	24
2.3.2.1. PCR.....	25
2.3.2.2. RT-PCR.....	26
2.3.2.3. Real-time PCR.....	27
2.3.2.4. Multiplex PCR.....	28
2.4. Gıdalarda enterik virus varlığı hakkında yapılan çalışmalar.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kabuklu deniz ürünleri.....	37
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeleri.....	37
3.1.3. Kullanılan laboratuvar cihazları.....	38
3.1.4. Test kitleri.....	38
3.1.5. Diğer gereçler.....	39
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Numunelerin hazırlanması.....	39
3.2.2. Numunelerin homojenizasyonu ve virus elüsyonu.....	41
3.2.3. Virus konsantre edilmesi.....	42

3.2.4. Viral DNA/RNA izolasyonu.....	43
3.2.5. Multiplex Real-time PCR.....	48
4. BULGULAR.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
KAYNAKÇA.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	95



KISALTMALAR

µL	: Mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AdV	: Adenovirus
AMV	: Avian Myeloblastosis Virus
AsV	: Astrovirus
AvAdV	: Avian adenovirusu
BAdV	: Bovin adenovirusu
C+	: Pozitif Control
CaCo-2	: Heterogeneous human epithelial cell line
CAdV	: Canine adenovirusu
CBV	: Liziz solüsyonu
CDC	: Center for Disease Control and Prevention
cDNA	: Komplementer DNA
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromid
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
DEPC	: Dietil pyrokarbonat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dTTP	: Deoksitimidin tripfosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPC	: Eksojen pozitif kontrol
FAO	: Food and Agriculture Organisation of the United Nations
HAdV	: Human Adenovirus
HAV	: Hepatit A virusu
HEV	: Hepatit E virusu
HPAI	: Highly Pathogenic Avian Influenza virus
HS	: Yıkama solüsyonu HS
IC	: Internal Control
kb	: Kilobaz
LS	: Yıkama solüsyonu LS
MA104	: Monkey kidney cell line
mL	: Mililitre
mM	: Milimol
MMLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksid
ng/µL	: Nanogram per mikrolitre
nm	: Nanometre
NTC	: Negatif kontrol
NV	: Norovirus

PCR	: Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PEG	: Polietilen glikol
PoAdV	: Porcine adenovirusu
PV	: Polyovirus
rEIA	: Recombinant Enzyme Immunoassay
RNA	: Ribonukleik asid
rpm	: Revolutions per Minute
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RV	: Rotavirus
SARS CoV	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SBS	: Bağlama solüsyonu
TEM	: Transmission Electron Microscopy
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Gıda kaynaklı virusların özellikleri.....	4
Çizelge 3.1 : Numune alma yeri ve miktarı.....	37
Çizelge 3.2 : Virus RNA/DNA izolasyon kitinin bileşenleri.....	44
Çizelge 3.3 : Liziz solüsyon CBV/Carrier Miks karışımın hazırlanması.....	46
Çizelge 3.4 : PCR reaksiyon karışımı.....	50
Çizelge 3.5 : Kullanılan PCR fluorophore kanalları.....	52
Çizelge 3.6 : PCR sıcaklık profili.....	52
Çizelge 4.1 : Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden alınan midye numunelerinin analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.2 : Rumeli Kavağı'ndan alınan midye numunelerinin analiz sonuçları...	59
Çizelge 4.3 : Beyoğlu'ndan alınan midye numunelerinin analiz sonuçları.....	59
Çizelge 4.4 : Numune alınan yere göre midye numunelerinin adenovirus (AdV) astrovirus (AsV) ve rotavirusun (RV) dağılım oranı.....	60



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Rotavirus viryonunun şematik simgelemesi.....	7
Şekil 2.2 : Rotavirusların elektron mikroskopik görünümü.....	8
Şekil 2.3 : Adenovirusların elektron mikroskopik görünümü.....	10
Şekil 2.4 : Küresel, zarfsız ve yirmiyüzlü astrovirus viryonunun görünümü.....	12
Şekil 2.5 : Human astrovirusunun çevresel yayılmasının yolları.....	13
Şekil 2.6 : PCR prosedürü.....	26
Şekil 3.1 : (<i>Mytilus edulis</i>) midyenin yan kesit görünümü.....	40
Şekil 3.2 : (<i>Litopenaeus vannamei</i>) karidesin anatomisi.....	40
Şekil 3.3 : Sindirim dokusu homojenizasyonu.....	41
Şekil 3.4 : Sindirim dokusu homojenizasyonu.....	41
Şekil 3.5 : Homojenizatin santrifüjlemesi.....	42
Şekil 3.6 : Buz üzerinde presipitasyon işlemi.....	42
Şekil 3.7 : Buz üzerinde presipitasyonu.....	43
Şekil 3.8 : Elde edilen pelet.....	43
Şekil 3.9 : Virus izolasyon işlemi.....	47
Şekil 3.10 : PCR karışımın hazırlanması.....	51
Şekil 3.11 : PCR kuyucuk doldurulması.....	51
Şekil 3.12 : Kuyucukların kısa santrifüjlemesi.....	51
Şekil 3.13 : Real-time PCR.....	52
Şekil 3.14 : PCR sıcaklık profili.....	53
Şekil 4.1 : PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 1.....	55
Şekil 4.2 : PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 2.....	56
Şekil 4.3 : PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 3.....	56
Şekil 4.4 : PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 4.....	57
Şekil 4.5 : PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 5.....	57
Şekil 4.6 : Gürpınar Su Ürünleri Hali’nden Nisan-2017’de alınan midye numunelerinde adenovirus, astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı.....	61
Şekil 4.7 : Rumeli Kavağı’ndan Nisan-2017’de alınan midye numunelerinde adenovirus, astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı.....	62
Şekil 4.8 : Beyoğlu’ndan Nisan-2017’de alınan midye numunelerinde adenovirus astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı.....	63
Şekil 4.9 : Tüm midye numunelerinde adenovirus oranı.....	64
Şekil 4.10 : Tüm midye numunelerinde astrovirus oranı.....	64



İSTANBUL'UN FARKLI YERLERİNDEN TOPLANAN MİDYE VE KARİDESLERDE ROTAVİRUS, ADENOVİRUS VE ASTROVİRUS VARLIĞININ REAL-TIME PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Viruslar gıda vasıtasıyla en yaygın bulaşan patojenlerden biridir. Virus kontaminasyonları başlıca çevrenin atık sularla kirlenmesi vasıtasıyla meydana gelmektedir. Sebzeler, kabuklu deniz ürünleri ve çeşitli hazır yemekler gibi birçok farklı gıda maddeleri gıda kaynaklı virutik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Epidemiyolojik bulgulara göre insana ait enterik viruslar kabuklu deniz ürünleri vasıtasıyla en çok aktarılan etyolojik ajan olarak tanımlanmaktadır.

İstanbul sahillerinde midye ve karides yoğun bir şekilde satılmakta ve çeşitli yöntemlerle pişirilerek tüketilmektedir. Bu çalışmada İstanbul'da avlanıp tüketilen midye ve karides numunelerinde, Real-time PCR yöntemi kullanılarak adeovirus, rotavirus ve astrovirus varlığı araştırılmıştır.

Bu amaçla Nisan (2017) ayı içinde farklı balıkçı teknelerinden, Beylikdüzü İlçesi'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden 8 kg karides numunesi toplanmış ve 400 gramlık 20 partiye bölünmüştür. Bunun dışında, Büyükçekmece İlçesi'nden Mimarsinan Balıkçı Barnağı'ndan alınan 3,2 kg karides numunesi 400 gramlık 8 partiye bölünmüştür. Ayrıca, Nisan (2017) ayında, Beylikdüzü İlçesi'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nde balıkçı teknelerinden alınan 500 midye numunesi, 25 adetlik 20 partiye bölünmüştür. Rumeli Kavağı'ndan balık satış yerlerinden 350 midye numunesi toplanmış ve 13 partiye bölünmüştür. Beyoğlu'ndan lokantalardan alınan toplam 500 midye numunesi, 25 adetlik 19 partiye bölünmüştür. Tüm midye ve karides numunelerinin, hiçbir kimyasala maruz kalmamış, işlenmemiş ve canlı olmasına dikkat edilmiştir. Alınan midye ve karides numunelerinin sindirim dokuları çıkarılarak 18-22 gram olacak şekilde birleştirilmiş ve Real-time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

Toplam çalışılan 52 parti (1350 adet) midye numunesinin 24 partisinde (%46,15) adenovirus, 33 partide (%63,46) astrovirus ve 21 partide (%40,38) hem adenovirus hem de astrovirus saptanmıştır. Rotavirus hiçbir midye numunesinde tespit edilmemiştir. Karides numunelerinin hiçbirinde araştırılan virusların hiçbirisi saptanmamıştır.

İstanbul'da balıkçı tekneleri, balıkçı dükkânları ve lokantalardan alınan midye numunelerinde yüksek oranda adenovirus ve astrovirus saptanmış olması, gıda güvenliği için önemli bir konu olan enterovirusların halk sağlığı açısından önemli bir risk olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Midye - Karides - Rotavirus – Adenovirus – Astrovirus – RT-PCR.



RESEARCH ON THE PREVALENCE OF ROTAVIRUS, ADENOVIRUS AND ASTROVIRUS IN MUSSELS AND SHRIMPS COLLECTED FROM DIFFERENT AREAS OF ISTANBUL USING REAL-TIME PCR METHOD

ABSTRACT

Viruses are one of the most common pathogens transmitted via food. Viral contamination can occur mainly through sewage pollution of the environment. Vegetables, shellfish and a great variety of ready-to-eat foods have been implicated in foodborne viral infections. Based on epidemiological evidence, human enteric viruses can be considered as the most commonly transmitted etiological agents by bivalve shellfish.

Shrimps and mussels are frequently sold along the shores of Istanbul. In this study, mussel and shrimp samples collected and sold in Istanbul were tested for the prevalence of adenovirus, rotavirus and astrovirus using Real-time PCR method.

For this purpose, 8 kg shrimp samples were collected in April (2017) from different fishing boats from the Gürpınar seafood market in Beylikdüzü county and divided into 20 groups of 400 gram each. 3.2 kg shrimp samples were collected from the Mimarsinan fishers port in Büyükçekmece county and divided into 8 groups of 400 grams each. Moreover, in April (2017), a total of 500 mussel samples were collected from fishing boats in the Gürpınar seafood market in Beylikdüzü county and divided into 20 groups with each group containing 25 pieces. 350 mussel samples were collected from fish selling shops in Rumeli Kavağı county and divided into 13 groups with each containing 25 pieces. 500 mussel samples were collected from restaurants in Beyoğlu county and divided into 19 groups of 25 pieces. It was made sure that all samples were collected lively, unprocessed and not exposed to any chemicals. After collection, for each of the total 52 mussel samples and 28 shrimp samples, 18-22 grams of digestive tissue were extracted and analyzed with Real-time PCR method.

Of the total 52 tested mussel sample groups (1350 pieces), 24 groups (46.15%) contained adenovirus, 33 groups (63.46%) contained astrovirus and 21 groups (40.38%) contained both astrovirus and adenovirus. Rotavirus was not detected in any of the tested mussel samples. Rotavirus, adenovirus and astrovirus were not detected in any of the analyzed shrimp samples.

The fact that adenovirus and astrovirus were detected in high ratios in the tested mussel samples, which were collected from fishing boats, fish shops or restaurants in Istanbul, indicates the necessity of further research in the field of enteric viruses as a significant issue from the perspective of both food safety and public health.

Keywords: Mussels - Shrimps - Rotavirus – Adenovirus – Astrovirus – RT-PCR.



1. GİRİŞ

Gıdanın ve suyun viruslarla kontaminasyonu insan sağlığı için önemli tehlikelere yol açmaktadır. Birçok gıda maddesi gıda kaynaklı salgınlarda önemli rol oynamakta, ancak kabuklu deniz ürünleri, soğuk yemekler ve taze ürünler (meyve ve sebzeler) en önemli taşıyıcı olarak sayılmaktadır. Son yıllarda ahududu (Ponka ve diğ., 1999), çilek (Gaulin ve diğ., 1999), kuyu suyu (Beller ve diğ., 1997) ve istiridye (Kohn ve diğ., 1995) viral gıda kaynaklı salgınlara kaynağı olarak saptanmıştır.

Kabuklulara virus kontaminasyonunun kaynağı suların dışkıyla kirletilmesi olup, taze ürünlerin kontaminasyonu ise kirletilmiş sulama veya yıkama suları kullanılması, gıda hazırlanan veya işleyen ve enfekte olan gıda çalışanları veya taze ürünlerin kirletilmiş yüzeylerle temas etmesi vasıtasıyla meydana gelmektedir (Goyal, 2006).

Virusla bulaşmış sularda yetişen ve bu sulardan elde edilen kabuklu deniz hayvanları gastroenterit ve hepatit hastalıklarının iyi belgelenmiş kaynağı olarak tanınmaktadır (Dienstag ve diğ., 1976; Richards, 1987). Kabuklular, filtrasyonla beslenen hayvanlar olduklarından dolayı, onların yenilebilir dokularında virus ve bakteriler yoğunlaşma eğilimi gösterirler ve bu yüzden kabuklularda bu mikroorganizmaların konsantrasyonunun çevreleyen sulardan çok daha yüksek olması beklenilmektedir (Abad ve diğ., 1997a).

Kirletilmiş atık sularda insanlarda farklı hastalıklar yapan yüzden fazla virus türü bulunmaktadır. Bu viruslar insanlarda hepatit, gastroenterit, menenjit, ateş, isilik, konjunktivit gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Craun, 1991).

Rotaviruslar ishal sebebiyle bir milyon çocuğun ölmesinden sorumlu tutulmaktadır (Farthing, 1989). Adenovirus, Astrovirus, Norwalk, Hepatiti E ve diğer küçük yuvarlak biçimli viruslar da önemli viruslardır ve kirletilmiş suyun veya kabuklu deniz ürünlerin tüketilmesiyle bulaşabilmektedir (Bosch, 1998).

İshal dünya çapında beş yaş ve altı çocukların ikinci önde gelen ölüm nedeni olarak sayılmakta, her yıl 525,000 çocuğun ölmesinden sorumlu olmaktadır. İshal birkaç gün sürebilir ve vücudu hayatta kalmak için gerekli olan su ve tuzlardan yoksun

bırakmaktadır. Geçmişte, insanların çoğu için ishal ölümünün başlıca nedenleri şiddetli dehidrasyon ve sıvı kaybıydı. Şimdi, septik bakteriyel enfeksiyonlar gibi başka nedenler de ishal ile ilişkili olan ölüm vakalarının artan oranına neden olmaktadır (WHO, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Kaynaklı Hastalıklar Epidemiolojisi referans grubunun (Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group) ilk bulgulara göre, 2010'da bütün dünyada tahmini 22 farklı gıda kaynaklı enterik hastalığı 582 milyon olayı meydana gelmiş ve 351.000 ölüm vakası olmuştur. Daha ileri tahminler, ölüm vakalarının büyük kısmından sorumlu olan gıda kaynaklı enterik hastalık ajanları *Salmonella Typhi* (52.000 ölüm vakası), enteropatojenik *Escherichia coli* (37.000) ve norovirus (35.000) olduğunu göstermektedir. Bulaşmış gıdanın tüketilmesinden kaynaklanan enterik hastalıklardan muzdarip olan kişilerin %40'ı beş yaş ve altı çocuklardır (WHO, 2015).

Çocuklar, erken çocukluk döneminde grup A rotaviruslar, enterik adenoviruslar, astroviruslar ve caliciviruslar ile enfekte olabilmekte, bu virusa karşı kısmi bağışıklık kazanabilmektedirler (Glass ve diğ., 2001). Çocukluk virusları denilen mikroorganizmalar çocuktan çocuğa tesadüfi temas ve fomitler vasıtasıyla kolaylıkla aktarılabilmektedirler (Richards, 2006).

Gıda kaynaklı birçok bakteriyel hastalıkların aksine, gıda kaynaklı virus hastalıklarının insidensinin belirlenmesi zordur. Kısmen çünkü bahsedilen viruslar, hepatit E virusu dışında, insanlar arasında çabuk bir şekilde yayılmaktadır. O nedenle, insidens rakamların yanında, gıda tüketmesine bağlı tüm hastalıkların oranının değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok ülkede en yaygın gıda kaynaklı virus olan norovirus için, bir epidemiolojik izleme sistemi bulunmamaktadır. Yine de izleme sistemi mevcut olan yerlerde, gıda kaynaklı olan hastalıkları güvenilir bir şekilde tahmin edebilmek için veriler oldukça yetersizdir (FAO/WHO, 2008).

Türkiye'de enterik virusların deniz ürünlerinde yayılma oranı hakkında daha iyi fikir oluşturabilmek için ve gelecekte bu yayılmayı engellemek için gerekli önlemlerin alınıp, gıdaları tüketmeden önce doğru şekilde işleyebilmek için, çalışmamızda İstanbul'un farklı yerlerinden toplanan midye ve karides numunelerinin rotavirus, adenovirus ve astrovirusun varlığının Real-time PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterik Viruslar

Son yıllarda bütün dünyada gıda kaynaklı hastalıkların insidansı artmakta, viruslar bu hastalıkların önemli nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan enterik viruslar, insan bağırsağında bulunup, insan dışkılarıyla vücuttan çıkarılıp, feka-oral yoluyla aktarılmaktadır. Sindirim sisteminde bulunan tüm virus türleri gıda kaynaklı patojen olarak tanınmamaktadır. İnsan dışkısında bulunan enterik viral patojenler norovirusu (önceden norwalk benzeri virus olarak da bilinen), enterovirusu, adenovirusu, hepatit A virusu (HAV), hepatit E virusu (HEV), rotavirusu ve astrovirusu kapsamaktadır. Bu virusların çoğu gıda kaynaklı hastalık salgınları ile ilişkili görülmektedir (Greening, 2006).

Adenovirus dışında, bütün enterik viruslar DNA yerine RNA içerirler, nükleik asiti korumak için protein kapside sahiptirler ve zarfsızdırlar. Mecburi parazit olduklarından dolayı enterik viruslar çevrede ve gıdada inert parçacıklardır ve bu ortamlarda çoğalamazlar. Çoğalabilmek için canlı hücrelere ihtiyaç duymaktadırlar. Çizelge 2.1’de gıda kaynaklı virusların özellikleri görülmektedir (Greening, 2006).

Enterik viruslar kabuklularda, tatlı su, nehir ağızı ve deniz sularında 4 °C’de haftalarca kendilerini enfektif tutabildikleri gösterilmiştir (Directorate G., 2002). Virusun yaşamı sürdürebilme süresinin sıcaklıkla ilişkili olduğu saptanmıştır; sıcaklık artışı ile ters orantılıdır. Viruslar parçacık maddelere veya sedimentlere bağladığı zaman daha uzun dayanır ve insan sağlığı için daha büyük risk oluşturmaktadırlar (Jaykus ve diğ., 1994).

Enterik viruslar genellikle ısı ve ekşime dahil çevresel zorluklara dayanıklıdırlar. Onların büyük kısmı dondurma ve kurutmaya dirençli olup, lipid çözücü maddelerin bulunduğu ortamında stabildir. 60 °C’de otuz dakikalık pastörizasyonun tüm enterik virusların etkisiz hale getirip getirmediğini belirsizdir. Birçok enterik virus ultra yüksek hidrostatik basınca mukavemet göstermekte ve bu teknik şu anda kabuklular, reçeller, marmelatlar ve süt ürünleri için yeni bir gıda işleme muamelesi olarak kullanılmaktadır (Wilkinson ve diğ., 2001; Kingsley ve diğ., 2002).

Çizelge 2.1 Gıda kaynaklı virusların özellikleri (Greening, 2006)

<i>Virus cinsi veya türü</i>	<i>Aile</i>	<i>Nükleik asitin çeşiti</i>	<i>Kılıf</i>	<i>Morfoloji/Simetri</i>	<i>Viryon hacmi (nm)</i>	<i>Kültür edilebilir^a</i>	<i>Genom hacmi (kb)</i>	<i>Hastalık</i>
Adenovirus	Adenoviridae	dsDNA	N	ikosahedral	70–90	Y ^a	28–45	Solumun, göz, ve gastroenterit enfeksiyonu
Astrovirus	Astroviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	28–30	Y ^a	7–8	Gastroenterit
Norovirus	Caliciviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	28–35	N	7.4–7.7	Salgın gastroenterit
Sapovirus	Caliciviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	28–35	N	7.4–7.7	Gastroenterit
Hepatovirus: hepatitis A virus	Picornaviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	27–32	Y ^a	7.5	Karaciğer iltihabı, hepatit
Hepevirus: hepatitis E virus	Hepeviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	32–34	N	7.2	Karaciğer iltihabı, hepatit
Rotavirus	Reoviridae	dsRNA	N	ikosahedral	60–80	Y	16–27	Gastroenterit
Enterovirus	Picornaviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	28–30	Y ^a	7.2–8.4	Poliyomiyelit, menenjit, ensefalit
Parvovirus	Parvoviridae	ssDNA	N	ikosahedral	20–30	N	5	Gastroenterit
Tick-borne encephalitis virus	Flaviviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	45–60		9.5–12.5	Süt vasıtasıyla keneyeyle geçen ensefalit
Coronavirus	Coronaviridae	(+) ssRNA	Y	Spiral	80–220	Y ^a	20–30	Gastroenterit, solumun enfeksiyonu
Torovirus	Toroviridae	(+) ssRNA	Y	Spiral	100–150	Y	20–25	Hayvanlarda ve/veya insanlarda gastroenterit
Picobirnavirus	Birnaviridae	(+) ssRNA	N	ikosahedral	35			Hayvanlarda ve/veya insanlarda gastroenterit

^a Bir türün bütün suşları kültür edilemez; yabani tür suşları genelde zorlukla kültür edilebilir

Enterik virusların çevresel faktörlere dayanıklılığı, memeli bağırsağının asidik özelliğine ve onikiparmak bağırsağının da proteolitik ve alkalik faaliyetine karşı katkıda bulunmakta, virusların bu bölgelerden geçmesinde ve kalın bağırsakta kolonize olmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, bu özellikler enterik virusların asidik ve marine edilen, dondurulmuş gıdalar ve kabuklu deniz ürünleri gibi az pişirilmiş yemeklerde yaşamını sürdürmesine izin vermektedir. Enterik virusların çoğunun 10-100 arasında ya da hatta daha az bir enfeksiyöz doza sahip olduğuna inanılmaktadır. Dolayısıyla, gıdalarda çoğalmamasına rağmen, yeterli sayıda bulaşıcı virionlar gıdada hayatta kalabilip, tüketilebilir ve bu şekilde hastalık yapabilmektedirler (Greening, 2006).

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan virusların çoğu insan kökenlidir ve virus kontaminasyonunun kaynağı genelde insan dışkısından kaynaklanmaktadır. Gıdaların virüsle bulaşması gıda zincirindeki herhangi bir aşamada (hasat öncesi veya sonrası, ürünün toplama zamanı, işleme veya dağıtma) meydana gelebilmektedir. Taze ürünlerin kirlenme riskini etkileyen anahtar faktörler suyun kalitesi, gıda çalışanlarının hijyenini kapsamaktadır. Böylece, atık su ile kirlenme ve kötü hijyenik davranışlar kontaminasyonda önemli rol oynamaktadır.

Hasat öncesi ve sonrasındaki virus kirlenme olasılıkları sayısızdır. Yetiştirilen suların niteliği kabukluların kalitesi için önemlidir. Kabuklu deniz hayvanları atık su veya dışkıyla kirletilmiş sularda yetiştirler ise, hasat öncesindeki virus kirlenmesi meydana gelmektedir. Kabuklu deniz hayvanları ağır metal, bakteri ve virusları kapsayan gıda parçacıkları yığarak her saat 4 ve 20 litre su arasında filtre ederler. Besleme oranı suyun sıcaklığına, tuzluluğa ve gıdanın ve parçacık maddenin kullanılabilmesine bağlı olmaktadır. Bakteri ve viruslar solungaçtaki mukusa kısılır ve sonra da sindirim bezine girer ve içinde yoğunlaşır. Çevreleyen sular yüksek virus miktarı içerirler ise, kabuklular birkaç saat içinde yüksek virus konsantrasyonu yığabilmekte ve bu konsantrasyon çevreleyen sulardan yüzden bin kata kadar daha yüksek olabilmektedir (Greening, 2006).

Taze ürünler insan dışkısı içeren suyla sulanabilmek veya yıkanabilmekte, yetersiz hijyenik davranışlara sahip olan alan işçiler veya gıda çalışanları tarafından işlenebilmektedir. Böyle durumlarda, gıda ürünleri hastalık yapan enterik viruslarla bulaşmış olması beklenilmektedir. Kabuklu deniz ürünleri, yumuşak böğürtlen meyvesi, otlar ve yeşil salatalar hasat öncesi aşamasında en büyük virus

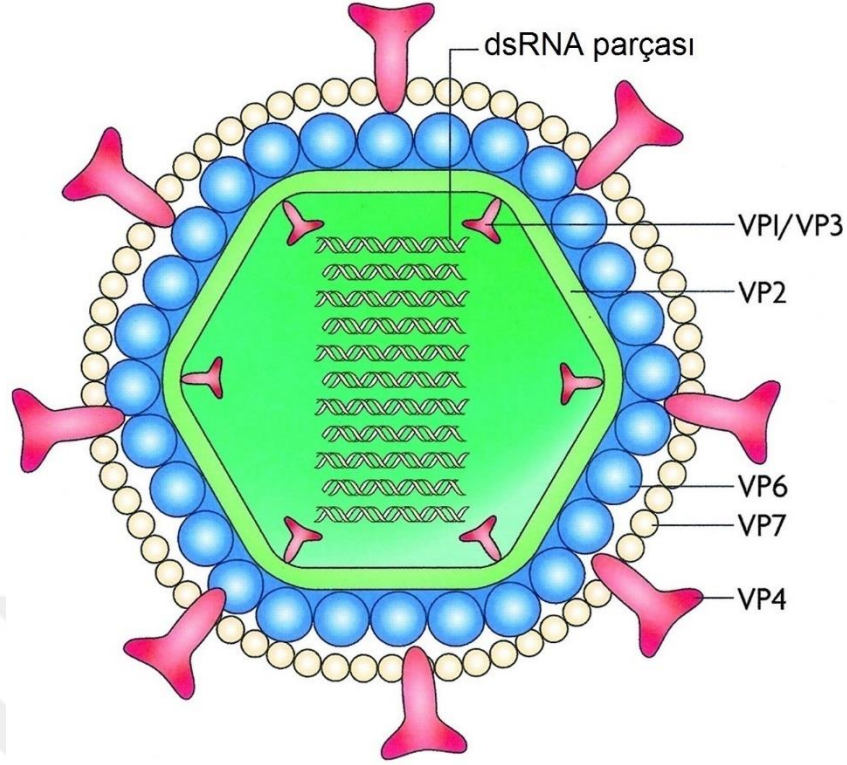
kontaminasyon riski taşıyan gıdalardan sayılmaktadır. Kötü gıda işleminin Hollanda'da norovirus ve adenovirusun aktarılmasında anahtar risk faktörü olduğu saptanmıştır (de Wit ve diğ., 2003).

Bütün gıda kaynaklı viruslar feka-oral yoluyla aktarılmaktadır. Genelde insanlar için konakçıya özgüdürler, ancak aynı virusun hayvansal suşları bulunabilmektedir. Viruslar sıklıkla sadece bir türde yetişmeyi tercih etmektedirler. Hem insana ait hem de hayvansal suşlar tüm enterik virusların cinslerinde bulunmaktadır.

Son zamanlarda gıdalarda virusların tespitinin metodolojisindeki gelişmelerin sonucu olarak gıda kaynaklı virusların rolü ve kapsamı aydınlatılmıştır. PCR yöntemi dahil yeni yöntemlerin geliştirilmesi ile, kültüre edilemez ya da zor kültüre edilebilir virusların çevrede ve gıdalarda, özellikle kabuklularda, sık görülen varlığı gösterilmiştir. Bununla beraber, bu yöntemlerin sayesinde virusların çevresel zorluklara karşı yanıtının araştırılması ve gıdalarda ve çevrede enterik virusların davranışları daha iyi anlaşılması mümkün olmuştur (Greening, 2006).

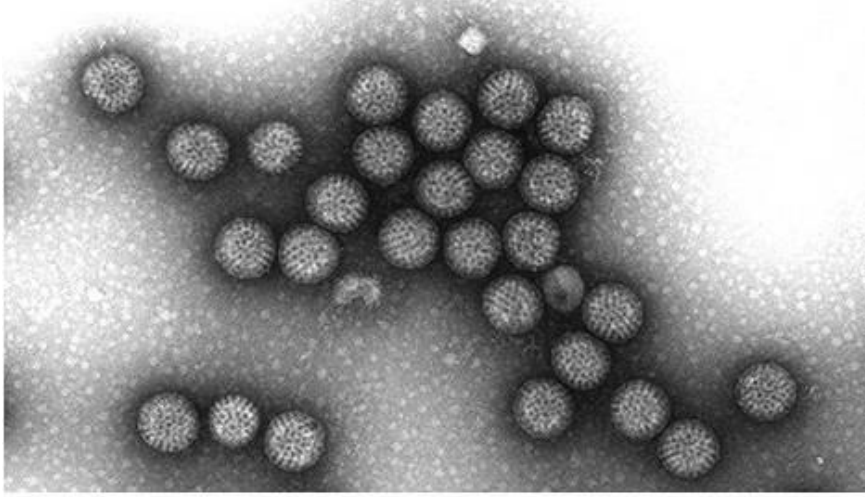
2.1.1. Rotavirus

Rotaviruslar *Reoviridae* ailesine ait olup, 60 – 80 nm arasında, zarfsız, çift zincirli RNA viruslardır ve yirmiyüzlü kapsid simetrisine sahiptirler. 16 – 27 kb büyük genomu çift protein katmanı ve iç çekirdekten oluşmuş üç katlı kapsid ile çevrelenmiştir. DNA'nın onbir bölümü, altı yapısal ve beş yapısal olmayan proteini kodlamaktadır. Yapısal proteinlerin iki tanesi, VP7 (glikoprotein) ve VP4 (protease ya da P protein), kapsidin dış kabuğunu oluşturur ve virusun infektivitesinde önemlidir. Bu iki protein rotavirusların serotiplerini tanımlamak için kullanılmakta; rotavirus A cinsi içinde 14 VP7 ve 11 VP4 serotipi bulunmaktadır. Kapsidin iç tabakasının üzerinde bulunan VP6 proteini grup-özel antijeni oluşturmaktadır ve rotavirus tanı testlerinin başlıca hedefidir. Bu proteinin koruyucu immunitenin gelişmesinde rol oynadığına inanılmaktadır. Replikasyon sırasında RNA'nın bölümlerinin genomik tekrar sıralaması meydana gelebilmektedir. Replikasyon aşamasında olgunlaşmamış virus parçacıklar konak hücrelerinin endoplazmik retikulumunda gelişirken geçici lipid zarfı kazanmaktadırlar (Greening, 2006). Şekil 2.1'de bir rotavirus viryonunun şematik simgelemesi görülmektedir (Dennehy, 2008).



Şekil 2.1 Rotavirus viryonunun şematik simgelemesi (Dennehy, 2008)

Rotaviruslar aşırı koşullara diğer enterik viruslar gibi aynı direnci göstermemesine rağmen, çevrede stabildirler ve 4 °C ve 20 °C’de dahi aylarca depolanabilmektedir. Kurutmaya dirençli olup, fomitler ve yüzeylerin üzerinde yaşamını sürdürebilmektedir. 50 °C’de 30 dakikalık ısıtma virusların infektivitesinin %99’a indirmekte, infektivite pH <3,0 ve >10,0’da çabuk kaybolmaktadır. Tekrarlanan donma çözülme işlemleri de virusların infektivitesini yok edebilmektedir. Viruslar eter ve kloroform gibi çözücü maddelere ve deoksikolat gibi non-iyonik deterjanlara dayanıklıdır. EDTA (Etilenediaminetetraasetik asit) gibi şelatlayıcı maddeler virusun dış kabuğunu bozup, rotavirusları etkisiz hale getirmektedir. Klorin, fenol, formalin ve %95 etanol gibi dezenfektanlarla muamele de rotaviruslara karşı etkilidir (Kapikian ve diğ., 2001). Normal pişirme sıcaklıkları rotavirusları inhibe etmek için genelde yeterlidir. Viruslar su ve atık suyun içinde bulunabilir, ayrıca içme suyunda mevcut olan klorin miktarlarına dirençli olup, çevrede kalıcıdır. Human rotavirusları nehir suyunda 4 °C ve 20 °C’de canlı kalabilmektedir (Greening, 2006). Şekil 2.2’de rotavirusların elektron mikroskopik görünümü gösterilmektedir (Gelderblom).



Şekil 2.2 Rotavirusların elektron mikroskopik görünümü (Gelderblom)

Rotavirus enfeksiyonunun inkubasyon süresi 1-2 gündür. Kusma ve sulu ishal dahil tipik belirtiler çabuk gelişip, 3-8 gün devam etmekte ve sıkça karın ağrısı ve ateş ile beraber görülmektedir. Özellikle etkin rehidrasyon tedavisi bulunmayan az gelişmiş ülkelerde, dehidrasyon rotavirus hastalığından kaynaklanan bebeklerin yüksek ölüm oranından sorumlu olmaktadır (Greening, 2006). Virus 5-7 gün sürecince dışkıyla çıkarılır ve büyük miktarda atılımı (dışkının her gramında $10^8 - 10^{11}$ virus parçacığı) ishalin birinci gününde başlamaktadır (Bajolet ve Chippaux-Hyppolite, 1998; Koopmans ve Duizer, 2004). Rotavirus genellikle feka-oral yoluyla ya da bulaşmış eller ve yüzeylerle aktarılabilmektedir. Yetersiz hijyenik şartlar virusun feka-oral aktarılmasını kolaylaştırmaktadır (Bajolet ve Chippaux-Hyppolite, 1998; Dennehy, 2000; Cook ve diğ., 2004; Vasickova ve diğ., 2005). Rotavirus hastalığı ılıman iklimli ülkelerde daha yaygındır. Salgınlar tropikal bölgelerde yılın serin ve daha kuru aylarında meydana gelmekte, özellikle içinde kirlenmiş su bulunan ve atık su arıtım sistemi mevcut olmayan yerlerde görülmektedir (Cook ve diğ., 1990; Ansari ve diğ., 1991).

Çok sayıda hayvan türü, insana ait türlerinden farklı rotaviruslar ile enfekte olabilmektedir. İnsana ait ve hayvansal rotaviruslar arasında genetik tekrar sıralaması meydana gelebilmekte, ancak VP6 antijeni her iki grupta müşterek kalmaktadır. Hayvansal genetik sıra özelliğine sahip olan reassortant viruslar insanlardan izole edilmiştir (Bajolet ve Chippaux-Hyppolite, 1998; Okitsu-Negishi ve diğ., 2004).

Rotavirus enfeksiyonu, doğrudan enfekte olan hayvandan elde edilen et ya da dolaylı çığ olarak yenilen bulaşmış gıdalar (meyve ve sebzeler) tüketildikten sonra

gelişebilmektedir (Richards, 2001). Bununla beraber, bir virus enfeksiyonu piştikten sonra kontamine olmuş gıdalardan da kaynaklanabilmektedir (Svensson, 2000; Cook, 2001; Cook ve diğ., 2004; Vasickova ve diğ., 2005).

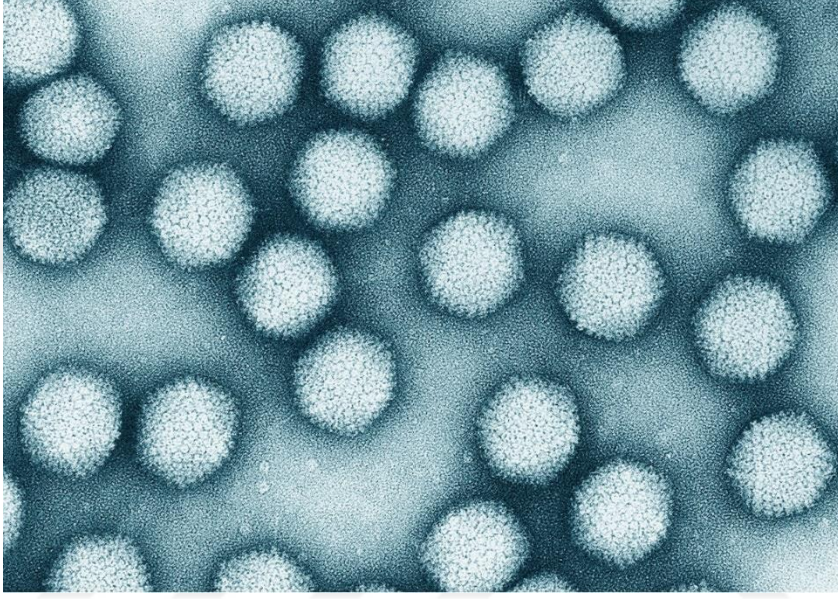
Human rotavirüsleri, özellikle grup A'ya ait olanlar, tüm dünyada bebekler ve küçük çocuklarda viral gastroenteritin ana nedeni olarak kabul edilmekle birlikte ancak ölüm oranı sadece gelişen ülkelerde yüksektir (Bajolet ve Chippaux-Hyppolite, 1998). Bu virüslere karşı antikorlar yaklaşık her beş yaş altındaki çocukta bulunmasına rağmen, gelişmiş ülkelerdeki çocukların %20'sinde ölüme neden olmaktadır (Matsumoto ve diğ., 1989). Grup B'ye ait rotavirüsler yetişkinlerde gastroenterite sebep olmaktadır (Lees, 2000; Vasickova ve diğ., 2005).

Rotavirüsler pH 2 ve 37 °C şartlarda bir dakikadan daha az yarılanma ömrünü sahip olup, hızlıca inaktive edilmektedir. Bu asidik koşullar midede kaşılaşılacak koşulları benzetmektedir. Bu durum rotavirüsün 3 yaş ve altı çocuklarda rastlanmasını açıklayabilir; çünkü bu yaştaki çocukların mide asitliği normalden daha yüksektir (Baert ve diğ., 2009). Hastalıklardan Korunma ve Kontrol Merkezi'ne göre (CDC: Center for Disease Control and Prevention) ABD'de yıllık olarak rotavirüs hastalığı 3 milyondan fazla meydana gelmekte ve 15.433 olayın gıda kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Todd ve Greig, 2015).

2006 yılından beri, bütün dünyada yüzden fazla ülkede iki rotavirüs aşısının (RotaTeq, Merck & Co ve Rotarix, GSK Biologicals) kullanılmasına ruhsat verilmiştir (Vasikari ve diğ., 2006; Ruiz-Palacios ve diğ., 2006). 2009 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), başta çocuklarda yüksek ishal mortalite oranına sahip olan ülkeler olmak üzere bütün ülkelerin rotavirüs aşısını kendi milli aşılama programına ilave etmesini tavsiye etmiştir. 2014 yılının sonuna kadar 70'den fazla ülke, rotavirüs aşısını kendi çocuk aşılama programına eklemiştir. Rotavirüse karşı rutin çocukluk aşılması uygulayan birçok ülke, ishal ve rotavirüs hastalığının üzerinde aşılamanın çok büyük etkisi olduğunu rapor etmiştir (Patel ve diğ., 2012). Bununla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü'nün rakamlarına göre, dünya çapında beş yaş altındaki çocuklarda rotavirüs ölüm vakalarının sayısı 2000 yılında 528.000'den (465.000-591.000 aralığında) 2013 yılında 215.000'e (197.000-233.000 aralığında) düşmüştür (Tate ve ark., 2016).

2.1.2. Adenovirus

Adenoviridae ailesi dört cinsi kapsamaktadır. İnsana ait ve bazı hayvansal Adenoviruslar *Mastadenovirus* cinsinin üyeleridir. Adenoviruslar orta boyutlu (80 nm), zarfsız DNA virusları olup; elektron mikroskopunda düzenli yirmi yüzlü biçime sahiptirler (Vasickova ve diğ., 2005). Şekil 2.3'te adenovirusların elektron mikroskopik görünümü görülmektedir (Perelman School of Medicine).



Şekil 2.3 Adenovirusların elektron mikroskopik görünümü (Perelman School of Medicine)

Adenovirus yağ çözücüler ve şiddetli pH durumları dahil farklı kimyasal ve fiziksel ajanlara karşı dirençlidir (Enriquez ve diğ., 1995; Thurston-Enriquez ve diğ., 2003a, 2003b). Titre azalmadan birçok kez donma çözülme işlemlerine dayanabilmekte, ancak 56°C'de 10 dakikadan fazla ısıtma virüsü inaktive etmektedir. Adenoviruslar çevrede uzun süre canlı kalabilmekte ve bu virusların birçok çevresel şartlarda diğer enterik viruslardan daha stabil olduğuna inanılmaktadır (Greening, 2006).

Adenoviruslar, insan vücudunun yaklaşık her organını kapsayan çeşitli klinik hastalıklar ile ilişkili olmaktadır. Adenoviruslar yukarı (farenjit ve tonsilit) ve aşağı (bronşit, bronşiyolit ve zatüre) solunum sistemi hastalıkları, konjunktivit, sistit ve gastroenterit gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Değişik çalışmalarda HAdV'un (human adenovirusu), rotavirus ve norovirustan sonra, bebekler ve genç çocuklarda akut gastroenteritin üçüncü sebebi olduğu rapor edilmiştir (Rezig ve diğ., 2006; Horwitz, 2001). Cins F HAdV (özellikle serotipler 40 ve 41) akut gastroenterit ile birlikte daha çok görülmektedir (Ghebremedhin, 2014; Portes ve diğ., 2016). HAdV'la

görülen solunum hastalıkları genellikle cins B (serotip 3 ve 7), cins C (serotip 1, 2 ve 5) ve cins E (serotip 4) ile birlikte görülmektedir (Jin ve diğ., 2013).

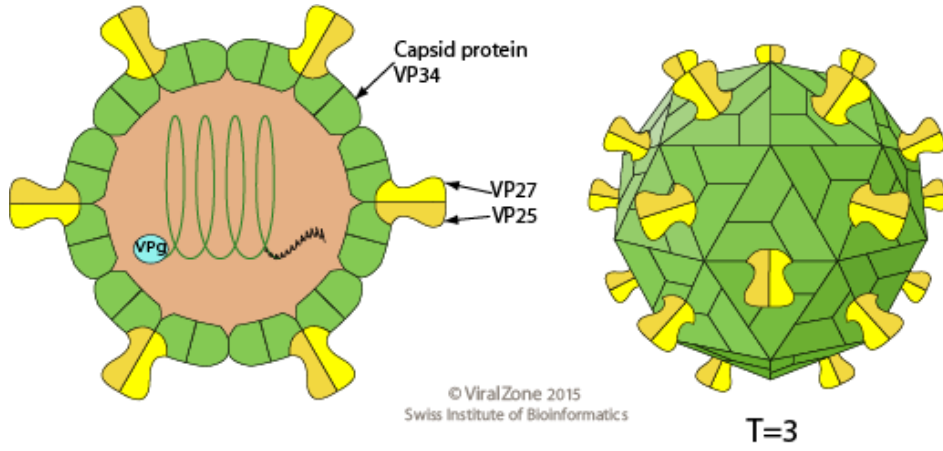
HAdV'lardan kaynaklanan hastalıkların çoğu akut ve kendi kendini sınırlayan hastalıklardır. Semptomatik evresi kısa olmasına rağmen, tüm adenoviruslar sindirim sisteminde kalabilmekte ve dışkıda atılması uzun sürebilmektedir (Wood ve diğ., 1988). Adenoviruslar feka-oral yolu ve bulaşmış gıda ve suyun alımı vasıtasıyla aktarılabilmektedir (Boone ve Gerba, 2007). HAdV'un çevrede (Lee ve Kim, 2002; Cheong ve diğ., 2009; Hartmann ve diğ., 2013) ve gıda matrislerinde (Cheong ve diğ., 2009) yüksek kararlılık gösterdiğini bilinmektedir. Ayrıca, Brezilya'ya ait çalışmalarda enterik HAdV'un sucul ortamlarda çok yaygın olduğu rapor edilmiştir (Miagostovich ve diğ., 2008; Barrella ve diğ., 2009; Moresco ve diğ., 2012; Fumian ve diğ., 2013; Prado ve Miagostovich, 2014). Büyük olaylar sırasında meydana gelen gastroenterit salgınları ile HAdV'u ilişkilendiren bir raporu bulunmamakla birlikte Rio 2016 olimpiyat ve paralimpik oyunlarında, bu virusların insan sağlığı açısından büyük risk oluşturduğu kabul edilmiştir. Ayrıca, bu viruslar sucul ortamlarda insan dışkı kontaminasyonunun belirteci olarak sayılmaktadır (Portes ve diğ., 2016).

Enfeksiyondan sonra virusun büyük miktarı aylarca veya yıllarca dışkı ve solunum salgılarında atılmaktadır. Enterik adenovirusların başlıca aktarma yolu feka-oral yoluken, enterik olmayan serotipleri ise aerosol ve direkt temas ile aktarılmaktadır. Adenovirusun su yoluyla aktarılması çocuklarda konjunktivite yol açmaktadır. Enterik adenovirus enfeksiyonları yıl boyunca yaygınken, solunum hastalıklar ile ilgili adenovirus salgınları genellikle kışın sonundan yazın sonuna kadar meydana gelmektedir (Greening, 2006).

2.1.3. Astrovirus

Astroviruslar ilk defa 1975 yılında tanınmış ve virusun elektron mikroskobu altında yıldızlı görünümüyle adlandırılmıştır (Madeley ve Cosgrove, 1975). Astroviruslar *Astroviridae* ailesine ait olup, *Mamastrovirus* cinsinin tek türüdür. Astroviruslar 6,8-8 kb genoma sahip olup, 28 – 30 nm arasında, küresel, zarfsız, pozitif iplikçikli, tek zincirli RNA viruslarıdır. Elektron mikroskobu ile astrovirusların sadece %10'u türe özgü beş ve altı köşeli yıldız morfolojisinde görülmektedir. Bundan dolayı virusun saptanma verimliliği moleküler tespit yöntemleri ve gelişmiş kültür teknikleri keşfine

kadar sınırlı kalmıştır (Greening, 2006). Şekil 2.4'te Astrovirus viryonunun görünümü görülmektedir (ViralZone, 2015).



Şekil 2.4 Küresel, zarfsız ve yirmiyüzlü astrovirus viryonunun görünümü (ViralZone, 2015)

Human astrovirusları 2-5 yaş ve altı çocuklarda ılımlı gastroenteritin sebebi olmakla birlikte, normalde kendi kendini sınırlayan 2-3 gün sulu ishale yol açmaktadır. İn vitro ve hayvanda denemelerine göre, human ve hindi astrovirusunun protein kapsidinin enterotoksin gibi davrandığı ve bağırsak epitel bariyerinin bozulmasına neden olduğu ortaya koyulmuştur (Meliopoulos ve diğ., 2016; Moser ve diğ., 2007). Kusma, astrovirus enfeksiyonunda, rotavirus ve norovirus enfeksiyonundan daha az yaygındır ve inkubasyon süresi astrovirus enfeksiyonunda biraz daha uzundur. Yenidoğanlarda, human astrovirusu enfeksiyonunun, doku ölümüne sebep olan enterokolit ile ilişkili olduğu iki farklı çalışmada saptanmıştır (Bagcı ve diğ., 2010; Chappe ve diğ., 2012; Vu ve diğ., 2017).

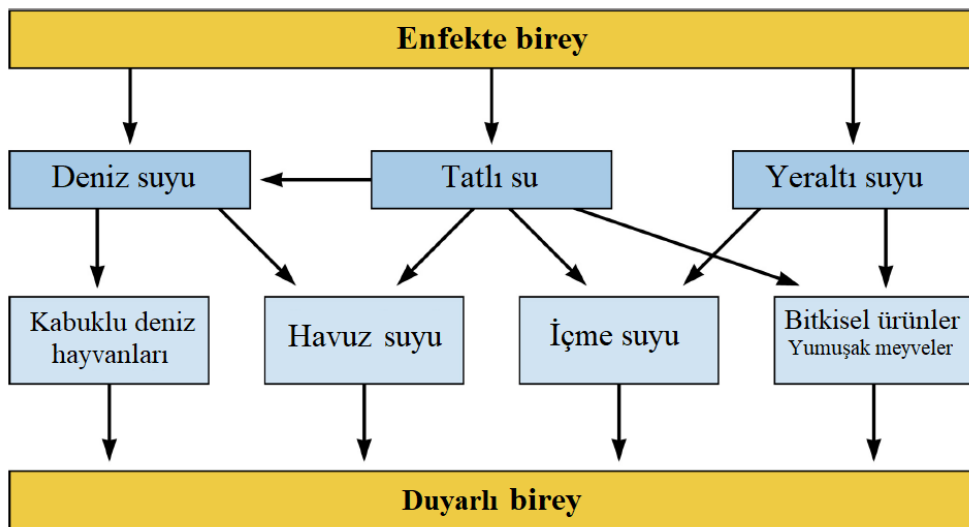
Human astroviruslar çocuklar ve yetişkinlerde belirtisiz enfeksiyonlara neden olmakta (Mendez ve Arias, 2007; Mendez-Toss ve diğ., 2004), belirti vermeyen gıda çalışanları belirtili çalışanlardan gastroenterit salgınlarına daha çok katkıda bulunmaktadır (Todd ve diğ., 2007). Gıda kaynaklı enfeksiyonların yayılmasında insana ait astrovirusun (human astrovirusu) semptom öncesi, semptom sonrası ve asemptomatik atılmasının anlamını araştırılması oldukça önemlidir (Bosch ve diğ., 2014).

İnsani astrovirus çocuklarda akut ishalin nedeni olarak sayılmakta, ishal salgınlara ve bazen de hastaneye yatırmaya sebep olmaktadır. Astrovirus hastalığı genellikle rotavirus hastalığından daha ılımlıdır. Ayrıca, çocukluk çağında sık görülen astrovirus, rotavirus ve calicivirus ile koenfeksiyon, epidemiyolojiyi zorlaştırmaktadır.

Astrovirüsler çoğunlukla gıda ve su kaynağından feka-oral yoluyla aktarılmaktadır (Yamashita ve diğ., 1991; Walter ve Mitchell, 2000; Vasickova ve diğ., 2005).

Gıda ve su insana ilişkin enterik virüslerin yayılmasında rol oynayabilmektedir (Bosch, 2007; Koopmans ve diğ., 2008). Çeşitli human astrovirüsü büyük salgınları kirlenmiş gıdanın tüketilmesiyle birlikte meydana gelmektedir (Matsui ve Greenberg, 1994; Mitchell ve diğ., 1995; Oishi ve diğ., 1994). Ayrıca, dışkı ile bulaşmış fomitler günlük bakım merkezleri, hastaneler, bakımevleri ve askeri tesisler gibi kurumlarda saptanan birçok salgınlara neden olmaktadır (Abad ve diğ., 2001; Gallimore ve diğ., 2005). Bununla birlikte, sudan kaynaklanan human astrovirüsünün aktarılması, genel popülasyonun sindirim morbiditesinin riski olarak kabul edilmiştir (Gofti-Laroche ve diğ., 2003). Astrovirüsün içme suyu (Abad ve diğ., 1997b), tatlı su ve deniz suyunda sağlamlığı bu virüsün çevresel yayılmasını desteklemektedir (Bosch ve diğ., 2014).

Human astrovirüsü, enfekte olan kişilerin dışkısında çok yüksek sayıda atılmaktadır. Virüsün atılması dışkının her gramında 10^{13} genoma kadar ulaşabilmektedir (Caballero ve diğ., 2003). Atık su arıtma uygulamaları patojen virüslerin tam yok edilmesini garanti etmemekte, arıtılmış ve arıtılmamış atık sularda bulunan human astrovirüsleri çevreye bulaşabilmekte (Le Cann ve diğ., 2004; El-Senousy ve diğ., 2007) ve deniz suyu, tatlı su ve yeraltı suyunun kontaminasyonuna sebep olmaktadır (Pinto ve diğ., 1996; Le Guyader ve diğ., 2000). Klor, diğer dezenfektanlar ile içme suyunun muamelesinde rutin olarak kullanılır ve suda human astrovirüsünün inaktive etmek için yararlıdır (Abad ve diğ., 1997b; Superti ve diğ., 1990). Şekil 2.5'te human astrovirüsünün çevresel yayılmasının yolları gösterilmiştir (Bosch ve diğ., 2014).



Şekil 2.5 Human astrovirüsünün çevresel yayılmasının yolları (Bosch ve diğ., 2014)

Kabuklu deniz hayvanları, bulaşmış sularla sulanan marul, yeşil soğan ve diğer yeşil sebzeler gibi taze ürünler, çilek ve ahududu gibi yumuşak meyveler hasat öncesi aşamasında human astrovirusu ile kirletilebilen duyarlı gıdalar arasında yer almaktadır (Pinto ve Bosch, 2008). Bu gıda ürünleri tüketimden önce genellikle yok dereceye kadar az işlem görmekte ve dolayısıyla insana ilişkin enterik virusların fomitleri olarak hizmet verebilmektedir (Kurtz ve Lee, 1987; Bosch ve diğ., 2014).

Virusun gıda ile aktarılmasının epidemiyolojik bulguları sınırlıdır, ama enfeksiyonlar kirletilmiş su ve kabuklu deniz ürünler üzerinden rapor edilmiştir (Oishi ve diğ., 1994; Appleton, 2001). Astrovirus dahil patojenik enterik viruslar kabuklularda RT-PCR ve hibridizasyon yoluyla saptanmıştır (Le Guyader ve diğ., 2000). Midye numunelerinin (%50) istiridye numunelerinden (%17) daha kirletilmiş olduğu ortaya koymuştur (Vasickova ve diğ., 2005). 1991 yılında Japonya’da 14 farklı okuldaki binlerce çocuk ve yetişkinleri kapsayan büyük bir akut gastroenterit salgını meydana gelmiştir (Oishi ve diğ., 1994). Okul öğle yemeklerini hazırlayan ortak bir tedarikçinin salgına neden olduğu ortaya çıkmıştır. Kabuklu deniz ürünlerinde belirlenmiş astrovirus genomlarının saptandığı birkaç Japon raporu bulunmaktadır ve kontamine istiridyenin tüketilmesi ile astrovirusların gıda kaynaklı gastroenterit salgınlarına katkıda bulunduğu hakkında kanıtlar bulunmaktadır (Kitahashi ve diğ., 1999; Greening, 2006).

2.1.4. Norovirus

Caliciviridae ailesine ait noroviruslar (NV), küçük ve pozitif-polariteli RNA viruslardır ve çocukluk çağının ikinci en yaygın akut gastroenteritinin nedeni olarak tanınmaktadır (Rackoff ve diğ., 2013). Dünya çapında akut gastroenterit salgınlarının %50 sinden sorumlu olup, bakteriyel olmayan akut gastroenterit salgınlarının %90'ında başlıca patojen olarak sayılmaktadır (Da Silva Soares ve diğ., 2014). Hastalarda kusma veya ishal görülebilmektedir ve karın ağrısı da yaygındır. Ortalama inkubasyon süresi 24-48 saattir ve belirtiler genellikle 12-72 saat arasında geçmektedir. İshalli dışkı kansız, mukus içermez ve sulu olabilmektedir. Bazı bireylerde düşük dereceli ateş gelişebilmektedir. NV bakımevleri ve diğer sağlık tesisleri gibi kapalı kurumlarda, yolcu gemileri ve immunitesi zayıflamış bireylerde gastroenteritin genel nedeni olduğu kabul edilmektedir (Da Silva Soares ve diğ., 2014; Clark ve Mckendrick, 2004). NV çoğunlukla, bulaşmış gıdanın veya suyun tüketilmesi, insandan insana temas ve bulaşmış çevreler (fomitler) gibi farklı yollarla

aktarılmaktadır (Sawyer ve diğ., 1988; Chadwick ve diğ., 1994; Marks ve diğ., 2000; Maunula ve diğ., 2004; Portes ve diğ., 2016).

VP1 amino asitin sıralamasına dayanılarak, NV altı genogrup olarak (GI-GVI) sınıflandırmaktadır. Her bir genogrup çeşitli genotiplere ayrılabilir ve bugüne kadar 36 genotipi tanımlanmıştır (Caddy ve diğ., 2014). NV'un geniş genetik çeşitliliğine rağmen, 1990 ortalarından beri, GII.4 genotipi bütün dünyada akut gastroenterit salgınlarıyla ilişkili olan en yaygın norovirus genotipi olduğu nitelendirilmektedir (Fankhauser ve diğ., 2002; Hasing ve diğ. 2013; Vega ve diğ. 2014). NV, son derece bulaşıcı, hızlı ve doğurganca saçılması, sürekli gelişen, sınırlı immuniteye neden olan, ılımlı virulan, gibi birçok niteliği sunmaktadır. Bu gibi nitelikler virusun bütün yaş gruplarında endemik ishalin önde gelen nedeni olduğunu, gıda kaynaklı hastanın önde gelen nedeni olduğunu ve bütün dünyada gastroenterit salgınlarının yarısından sorumlu olduğunu açıklayabilmektedir (Patel ve diğ., 2009; Hall ve diğ., 2011; Scallan ve diğ., 2011; Portes ve diğ., 2016).

2.1.5. Hepatit A virusu

Global olarak, her yıl tahmini 1,4 milyon hepatit A virusu (HAV) vakası ve 200 milyon asemptomatik taşıyıcı bulunmaktadır (WHO, 2014). İyi hijyenik altyapıya sahip olan gelişmiş ülkelerde enfeksiyon oranı düşüktür ve bu ülkelerin çoğu, endemik bölgelere seyahat eden çocuklar ve yetişkinler için bir aşılama programı uygulamıştır (Fiore ve diğ., 2006). HAV, insandan insana veya bulaşmış gıdalar ve su vasıtasıyla yayılabilmektedir (özellikle az pişirilmiş meyve veya hazır gıdalar). HAV'un bir gıda çalışanında tespit edilmesi durumunda, maruz kalan kişilere bildirilmekte ve onlara immunoglobülin verilmektedir (Fiore ve diğ., 2006). Klorin, peroksiasetik asit ve hidrojen peroksit gibi dezenfektanların eklenmesi taze ürünlerde sadece virus sayısını azaltmasına rağmen, be dezenfektanlar yıkama suyu ve taze ürünleri arasında çapraz kontaminasyonunun olasılığını düşürmek için faydalı olabilmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarının temiz suda bekletilerek filtrasyonla temizlenmesi, enfeksiyöz virus parçacıklarının hayvanın etinden uzaklaşmasını garanti etmemektedir. Deneysel olarak bulaştırılmış midyelerin 4 gün süreyle temiz suda filtrasyon yaptırılması HAV ve rotavirusun (RV) <2 log sayıca düşmesine yol açarken, human adenovirusu (HAdV) ve poliovirusun en az 3 log azalmasına sebep olmuştur (Baert ve diğ., 2009). Aşırı

derecede kontamine kabuklu deniz hayvanlarının saf suda haftalarca bırakılması iyi bir yöntem olarak sayılabilmektedir (Baert ve diğ., 2009; Todd ve Greig, 2015).

2.1.6. Poliovirus

Poliovirus poliyomyelit hastalığının etyolojik ajanıdır (insanları enfekte eden bir akut viral enfeksiyondur). Hastalığın farklı belirtileri arasında vakaların %1'sinde aseptik menenjit ve vakaların %1-1,6'sında klasik akut flask paralizidir. Hastanın ölüm riskini arttırarak, solunum ve yutma kaslarını etkileyen paraliz de meydana gelebilmektedir. Asemptomatik enfeksiyonlar vakaların %90-95'i oranında ortaya çıkabilmektedir (Stupka ve diğ., 2012). Poliovirus insandan insana, en önemli yayılma yolu olan feka-oral yolu ve bulaşmış gıdalar ve su vasıtasıyla aktarılabilmektedir. Bununla birlikte, ağız-ağız yolu da bazı olaylardan sorumlu olabilmektedir (Hird ve Grassly, 2012). İnkubasyon süresi 2 ve 35 gün arasındadır ve virusun dışkıda atılımı klinik belirtiler ortaya çıktıktan sonra 2-3 gün devam edebilmektedir (Mehndiratta ve diğ., 2014). Polio hastalığının tedavisi bulunmamakta, ancak hastalık çocukluk çağında uygulanan iki aşı (Parenteral etkisiz hale getiren poliovirus 1,2 ve 3 aşısı (IPV) ve üçdeğerli seyreltilmiş polio aşısı (tOPV)) sayesinde önlenebilmektedir (Sutter ve diğ., 2010; Portes ve diğ., 2016).

2.2. Virusların Bulaşma Yolları

Viruslar çoğunlukla feka-oral yolu vasıtasıyla yayılmaktadırlar. Dolayısıyla insanlar dışkı ile kirletilmiş gıdaları tükettikten sonra enfekte olmaktadır. Bahsedilen viruslar, midenin asidik koşulundan geçerek, sindirim sistemine girip, bir enfeksiyonu başlatmaktadırlar. Bu nedenle, başlıca gıda kaynaklı virus salgınları insanların dışkısında büyük miktarlarda atılan human viruslarından kaynaklanmaktadır. Virusun atılım miktarı dışkının her gramında 10^7 virus parçacığını aşabilmektedir. Virusların konakçı dışındaki dayanıklılığı gıda kaynaklı virusun aktarılmasını etkileyen başka önemli bir faktörü olarak sayılmaktadır. Gıda kaynaklı virusların asit, ısı, kurutma, basınç, dezenfektanlar ve ultraviyole radyasyonu gibi farklı çevresel zorluklara değişen dayanıklılığı göstermesine rağmen, genellikle sağlam tabiatlıdırlar ve çevrede iyi bir şekilde canlı kalabilmektedirler. Bu nedenle, gıdalara bulaşma olasılığı gıda zinciri boyunca oldukça büyüktür (FAO/WHO, 2008).

İnsanlarda hastalıklara neden olabilen hayvansal viruslar ayrı bir kategoridir. İnsan sağlığı için potansiyel risk oluşturan viruslar, gıda zincirine hem hayvansal ürünler vasıtasıyla hem de virus içeren dışkıının bir gıdayı kirlettiği zaman da girebilmektedir. Böyle viruslar insan popülasyona geçtikten sonra, insanlar arasında daha ileri yayılma meydana gelebilmektedir. Gıda kaynaklı bulaşma potansiyeline sahip olan hayvansal virusları hepatit E virusu, yüksek patojeniteli Avian Influenza (HPAI) H5N1 virusu (yüksek patojenik kuş gribi virusu), SARS CoV virusu (ağır akut solunum sendromu coronavirus) ve Nipah virusu kapsamaktadır (FAO/WHO, 2008).

2.2.1. Atık su ve insan dışkısı

Viruslar kanalizasyonla direkt temas yoluyla kazanılabilmektedir. Hepatit A enfeksiyonu atık su arıtım tesislerinde çalışanlarda saptanmıştır (Cadilhac ve Roudot-Thoraval, 1996). Bazı yaygın olarak kullanılan atık su arıtma yöntemlerinin virusları etkili bir şekilde uzaklaştırmak veya inaktive etmek için yetersiz olduklarını bilinmektedir. Avrupa, Japonya ve ABD’de yapılan farklı çalışmalarda işlenmiş kanalizasyon suyunun insan enterik virusları için hala pozitif olduğunu gösterilmiştir (van den Berg ve diğ., 2005; Villar ve diğ., 2007; Laverick, Wyn-Jones ve Carter, 2004; Silva ve diğ., 2007; Gregory, Litaker ve Noble, 2006; La Rosa ve diğ., 2007; Myrmel ve diğ., 2006; Ueki ve diğ., 2005). İnsan kanalizasyonu ile direkt temas kabuklu deniz hayvanlarının normal bulaşma yoludur.

Gıdaların atık suya bağlı kontaminasyonu ile birden fazla virus bulaşılabilir. Bunun sonucu olarak, insanlar eş zamanlı birden fazla virus suşu ile enfekte olabilmektedirler (Le Guyader ve diğ., 2006; Symes ve diğ., 2007). Genellikle bir türe ait birbirleriyle bağlantılı virus suşlarının bulunması ve bir konakçıda (hücre) çoğalması yeni virus suşlarının evrimi için elverişli bir ortam sağlayabilmektedir. Bu, iki yoldan biriyle oluşabilmektedir. Birinci yola rekombinasyon denir ve noroviruslar için ispat edilmiştir (Reuter ve diğ., 2006; Bull, Tanaka ve White, 2007). Rekombinant norovirusların asıl virus suşlarından farklı özellikleri bulunduğu hakkında herhangi bir kanıt bulunmamasına rağmen (Simmonds, 2006), rekombinant virusların beklenilmeyen davranışı gıda güvenliği açısından potansiyel bir endişedir. İkinci yola ise genomik tekrar sıralaması denir. Genomik tekrar sıralaması işlemi tek bir hücrenin koenfeksiyonundan sonra iki virus nesillerinde meydana gelip, yeni virusların oluşmasına yol açabilmektedir. Ayrıca, hayvansal rotaviruslarının insan

popülasyonuna girişi (zoonoz) meydana gelebilmektedir (Iturriza-Gomara ve diğ., 2001). Bütün bu mekanizmalar bireysel olarak ve kombinasyon halinde virus suşlarının çeşitliliğine katkıda bulunur.

2.2.2. Enfekte olan gıda çalışanları

Viruslar normalde enterik viruslarla enfekte olan kişilerin dışkıının her gramında 10^7 virus parçacığını aşan seviyelerde tespit edilmektedir. Fomitlerde virus parçacıklarının miktarı belli değildir. Viruslara maruz kaldıktan 12 saat sonra enfekte olan kişiler virusları dışkıyla çıkartmaya başlayabilmekte ve bu olay virus türüne göre haftalarca devam edebilmektedir (Rockx ve diğ., 2002). Dolayısıyla, enfekte olan kişiler belirti geliştirmeden önce ve hatta iyileştikten sonra virus parçacıkları dışkıyla atmaktadır. Bununla beraber, asemptomatik enfeksiyonlar oldukça yaygındır. Örneğin, bir salgın olayında norovirus gastroenterit hastalığından muzdarip olmayan kişilerin %19'unda saptanmıştır (Vinje, Altena ve Koopmans, 1997). Ayrıca, Hollanda'da yapılan bir çalışmada belirti vermeyen kişilerden alınan numunelerin %5,2'sinde norovirus varlığını saptanmıştır (de Wit ve diğ., 2001). İngiltere'de yapılan yeni bir çalışmada asemptomatik saçılma düzeyinin daha da yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Amar ve diğ., 2007).

Gıda çalışanları, virusları kendi dışkıyla saçtığına, bebek bezlerini değiştirdiği veya tuvalet alanları temizlediği ve uygun kişisel hijyeni uygulamadığı durumlarda kendi ellerini insana ait enterik viruslarla bulaştırabilmektedirler. Aynı viruslar insan derisinden (eller) gıdalara ve cansız yüzeylere kolayca aktarılabilmekte (Bidawid, Farber ve Sattar, 2000; Bidawid ve diğ., 2004) ve bu cansız yüzeyler gıdalarla temasa girerlerse ikincil bir kirlenme kaynağı olarak hizmet etmektedirler. İnsan muamelesinden kaynaklanan bir virus kontaminasyonu gıda zincirindeki (tarladan sofraya) herhangi bir aşamada meydana gelebilmektedir. İnsan elleri üretilen ürünlerin hasat sırasında, paketleme, dağıtma ve pazarlamada bulaşabilmektedir. Aynı zamanda, evlerde yemek hazırlayan kişiler, hazırlanan yemekleri tüketmeden hemen önce ellerine bulaştırabilmektedirler (FAO/WHO, 2008).

Kusma, gıda çalışanlarında virus yayılmasında diğer önemli bir faktördür. Norovirus enfeksiyonları genelde çok hızlı başlayan şiddetli kusmaya neden olmaktadır. Virus içeren kusmaya maruz kalmasından meydana gelen birçok salgın belgelenmiştir. Bir kişinin kusmuş olduğu bir alanda aerosolların oluşumu, çevrenin ve alandaki mutfak

eşyaları dahil cisimlerin geniş kontaminasyonuna yol açmaktadır. Yine de norovirus enfeksiyonların yayılmasında fomitlerin ve yüzeylerin nispi katılımı belirsizdir (Boone ve Gerba, 2007). Kirletilmiş bir çevrede virusların dayanıklılığı, temizlemeye ve dezenfeksiyona karşı dirençliği bu aktarma tarzında katkıda bulunabilmektedir.

2.2.3. Zoonotik bulaşma

Bir istiridye bir hayvansal virusu biriktirip (çevreyi kirleten domuz dışkılarından hepatit E virusu gibi) ve sonra da bunu bir insana aktarırsa, bu istiridye bir araç olarak kabul edilecek ve enfeksiyonu zoonotik olacaktır. Benzer bir şekilde, enfekte olan eti veya diğer hayvansal ürününün tüketilmesi vasıtasıyla bir hayvansal virusun insana aktarması zoonotik enfeksiyon olarak sayılmaktadır. Geyik ve yaban domuzunun çiğ etin ve karaciğerin üzerinden hepatit E virusun aktarılabilmesi hakkında kanıtlar vardır (Tei ve diğ., 2003, 2004; Takahashi ve diğ., 2004; Matsuda ve diğ., 2003). Domuz eti, organları ve dışkısında tespit edilmiş olup, hepatit E virusu domuz popülasyonlarında bütün dünyada mevcuttur, ama bu virusun zoonotik aktarılmasının önemi hala belirsizdir (FAO/WHO, 2008).

HPAI-H5N1 virusu kanatlı et ürünlerinde saptanmış (Tumpey ve diğ., 2002; Mase ve diğ., 2005; Swayne ve Beck, 2005; Promkuntod, Antarasena ve Prommuang, 2006) ve kedigiller ve köpeklerde hastalıklarından toplanan veriler sindirim yoluyla maruz kalmanın enfeksiyona neden olabileceğini önermektedirler (Kuiken ve diğ., 2004; Songserm ve diğ., 2006). HPAI-H5N1'in enfeksiyonu yumurtaların ve kanatlı etlerin tüketilmesiyle meydana gelebilmekte ve böylece virusun insanlara gıda kaynaklı bulaşması mümkün olmaktadır. SARS Coronavirusun dışkı yoluyla yayılmasının kanıtı Hong Kong'ta bir konut kompleksinde meydana gelen bir olaydan gelmektedir. Bu olayda arızalı bir kanalizasyon sistemi nedeniyle geniş bir grup insan dışkı bulaşması ile enfekte olmuştur. Bu hastaların enfeksiyon yolu oral veya virus içeren aerosollerini olup olmadığını bilinmemektedir. Ancak, salgında ishal SARS hastalarının yüksek bir oranında saptanmış ve sindirim sistemi ile bulaşma bu hastalıkların sebebi olabilmektedir (McKinney, Gong ve Lewis, 2006).

2.2.4. Kabuklular, özel virus araçları

Midye ve istiridye gibi kabuklu yumuşakçalar özellikle virus yayılmasına eğilimli olmaktadır. Bu canlıların içlerinde yetiştirildiği ortam gittikçe insan dışkısıyla kontaminasyonuna maruz kalmaktadır. Bu kontaminasyon atık sulardan ya da deniz

ürünleri toplayan ve enfekte olan kişilerden meydana gelebilmektedir. Kabuklular virus parçacıklarını filtrasyonla beslenme işlemi sırasında toplamaktadır. İnsan virusları bu tür hayvanları enfekte edemez, ancak kabukluların sindirim sisteminde günlerce ve haftalarca kalabilmektedir. Ayrıca, çift kabuklularda bulunan virusların uzaklaştırılması bu hayvanların temizleme işlemi sırasında bakterilerin uzaklaştırılmasından daha zor olabilmektedir (Grohman ve diğ., 1981; Power ve Collins, 1989). Diğer birçok deniz ürünlerinden farklı olarak, kabuklular genelde sindirim sistemi ile beraber, taze ya da az pişirilmiş yenilmektedir. Kabuklular diğer gıdalara benzemeyen bir şekilde virusları pişirilirken termal inaktivasyondan koruyabilmektedir (DiGirolamo ve diğ., 1970). Kabuklu deniz hayvanlarıyla ilişkili viral hastalığın birinci kaydedilmiş salgını, temiz istiridyelerin, satış bekleme esnasında, dışkıyla kirli bir limanda depolanmasından kaynaklanmıştır (Gard, 1957). Hepatit A 600 olaydan fazla meydana gelmiştir. Daha yakın zamanlarda, virus gastroenterit ve hepatit A salgınları genellikle pişmemiş kabukluların yemesiyle ilişkili olmaktadır. Midye ile ilişkili ve Şangay'da meydana gelen hepatit A salgını tarihte en büyük kaydedilmiş gıda kaynaklı hastalık salgınıdır (Halliday ve diğ., 1991). Kabuklu deniz hayvanlarıyla ilişkili sporadik virus hastalıklar da gösterilmiştir (Koff ve diğ., 1967); bu gibi araştırmalarda önyargıdan kaçınmak zordur çünkü, en azından kıyı devletlerde, hepatit A tanısı hastanın sürekli, diğer gıdaları hariç tutarak, kabuklu deniz hayvanları tüketimi konusunun sorulmasına neden olmaktadır (Cliver, 1997).

2.3. Gıdalarda Virusların Tespit Yöntemleri

Gıda kaynaklı salgınların ABD'de her yıl tahmini 76 milyon hastalığa, beş bin ölüme ve 325 bin hastaneye yatırma vakasına neden olduğunu inanılmaktadır (Mead ve diğ., 1999). Birçok vakaların nedeni bilinmemesine rağmen viruslar bu gibi vakalarda önemli rol oynamaktadırlar. Genellikle, gıda kaynaklı virus salgınlarının gerçek sayısı rapor edilen sayıdan daha yüksektir. Bir virus hastalığının etyolojisinin başarısız doğrulamasının nedenlerinden biri, bulaştıran gıdalarda virusların duyarlı ve güvenilir saptanma metodlarının eksikliğidir (Goyal, 2006).

Gıda kaynaklı virus hastalıkları büyük problem olmasına rağmen, gıdalar viral kontaminasyonu için nadiren kontrol edilmektedir. En önemli gıda kaynaklı virusların doku kültürlerinde üretilmesi zordur; viruslar doğrudan gıda ekstratlarında tespit edilmeli ve bu işlemde standardizasyon, PCR'da kullanılan enzimlerin inhibe

edilmesi, hatalı pozitif sonuçlar gibi birçok sorunlar meydana gelebilmektedir (Lees, 2000; Atmar ve diğ., 1993; Koopmans ve Duizer, 2004). Gıdalar genelde onları hazırlayan gıda çalışanları tarafından kontamine edilmektedir. Dolayısıyla, kontaminasyon seviyesi aynı ürünlerde bile değişik olabilmektedir (Vasickova ve diğ., 2005).

Gastroenterik virus enfeksiyonları düzenli olarak dışkı numunelerinin elektron mikroskobu ile incelenmesi vasıtasıyla tanımlanmaktadır. Özellikle human rotaviruslarının elektron mikroskobisi, pasif parçacık aglütinasyon testleri veya enzime bağlı immünosorbant yöntem (ELISA) dayalı metotlar klinik tanı için kolayca kullanılmaktadır. Yine de bu yöntemlerin duyarlılığı çevrede mevcut olan virus parçacıkların düşük sayısını saptanması için yeterince yüksek değildir. Çevresel numunelerin incelenmesi durumunda, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve reverse transkripsiyon PCR (RT-PCR) vasıtasıyla gerçekleştirilen virus nükleik asitlerin amplifikasyonu suda ve kabuklu deniz hayvanlarında geniş bir virus grubu saptanmak için artan biçimde kullanılmaktadır (Koopmans ve diğ., 2001; Buesa ve diğ., 2002; Bosch ve diğ., 2004; Di Pinto ve diğ., 2004).

ELISA adenovirusları ve astrovirusları tespit etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Sapoviruslar ve noroviruslar RT-PCR veya rekombinant enzim immün analizi (rEIA) kullanarak belirlenebilmektedirler (Hutson ve diğ., 2004). Rabenau ve diğerleri (2003) dışkı numunelerinde norovirusları saptanmak için PCR en yüksek duyarlılığa sahip olduğunu (%94,1), daha sonra da transmisyon elektron mikroskobisi (TEM; %58,3), ve ELISA (%31,3) geldiğini saptanmışlardır. Ancak özgünlük TEM için en yüksektir (%98,0), hemen sonra ELISA (%94,9) ve PCR (%92,4) gelmektedir. Rabenau ve diğerlerine göre, tüm bu üç metot gastroenterit salgınlarında yapılan epidemiyolojik araştırmalar için faydalı olabilir; ancak, tanı sağlamlığını en yüksek dereceye çıkarmak için en azından iki metot birleştirilmelidir (Rabenau ve diğ., 2003). Kabuklularda norovirus varlığını incelenmek için ve human adenovirusları için gerçek zamanlı (real-time) RT/nested PCR ve nested PCR analizleri sırasıyla kullanılmıştır (Myrmel ve diğ., 2004; Vasickova ve diğ., 2005).

Kabuklu deniz ürünlerinde virus belirlenmesi için farklı zorlukların üstesinden gelmek gerekir. Bir yandan, virusların kabuklularda oldukça az sayıda bulunmaları beklenilmekte ama yine de bu az sayılı virus parçacıkları sağlık riski oluşturmaktadır. Bu düşük virus yükü, kabuklu deniz hayvanlarının dokularından yüksek virus geri

kazanımını sağlayan yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Diğer yandan, kabuklu deniz ürünlerin ekstraktları son derece sitotoksiktir ve kültüre edilebilir virusları tespit etmek için doku kültürlerine inokulasyona uygun değildir. Bunun yanısıra, bu hayvanların ekstratları kültüre edilemez virusları tespit etmek için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı metodolojileri ile de uyumlu değildir ve özellikle öncelikle reverse transkripsiyon (RT-PCR) uygulanmak durumundadır (Bosch ve diğ., 2009). Geleneksel kabuklu deniz hayvanların ekstraksiyon yöntemleri her zaman PCR metodu ile uygun değildir, çünkü inhibitör maddeleri viruslar ile birlikte toplanır ve yoğunlaşır. Böylece temel amaç kabuklu deniz ürünlerin analizi için sitotoksik olmayan, ya da daha iyisi son derece saf ve PCR'a hiç inhibitör etkiye sahip olmayan nükleik asit üretilen yöntemlerin geliştirilmesidir. İnhibitörleri uzaklaştırmak için diyaliz, solvent ekstraksiyonu, proteinaz muamelesi, liyofilizasyon (kurutularak dondurma), jel veya cam filtrasyonu, nükleik asit adsorpsiyonu veya çöktürme, antikor saptanması ve ticari kitlerin kullanılması gibi çok çeşitli prosedürleri geliştirilmiştir (Tsai ve diğ., 1993; Atmar ve diğ., 1995; Jaykus ve diğ., 1996; Shieh ve diğ., 1999; Loisy ve diğ., 2000; Schwab ve diğ., 2000). Nitekim, RT-PCR'dan sonra elde edilen virus tespit etkinliği aslında iki faktörle ilişkilidir: Kabuklu deniz ürünün numunesine uygulanan ekstraksiyon yönteminin geri kazanım verimliliği ve kazanılmış virusun son saflık derecesidir (Bosch ve diğ., 2009).

Kabuklu deniz hayvanlarında virus saptanması ya parçalara ayrılmış sindirim dokusu ya da hayvanların bütün dokusunda yapılmaktadır. İnsan enterik virusların kabukluların dokusunda yerini belirlemesi hakkında yapılan çalışmalar bu virusların çoğu mide ve sindirim bezinde bulunduğu ortaya koymuşlardır (Abad ve diğ., 1997b; Romalde ve diğ., 1994). Atmar ve arkadaşlarına göre virus ekstraksiyonu için bu organların çıkarması virusun nükleik asitlerinin izolasyonu kolaylaştırıp hızlandırırken analiz edilen kabuklu hayvanın tane sayısı artırılarak testin sensitifitesi de yükselmiş olmaktadır (Atmar ve diğ., 1996). Virus saptanmak için mide ve sindirim bezinin incelenmesi ile bütün dokunun incelenmesi karşılaştırıldığında daha az zaman alıcı bir prosedür olması, yükseltilmiş test sensitifitesi ve azalmış PCR inhibisyonu gibi birçok avantaj sunmaktadır (Bosch ve diğ., 2009).

PCR reaksiyonun miktarları küçük ölçülü olduklarından dolayı, moleküler analizden önce yeniden konsantrasyon aşaması uygulanmaktadır. Guanidin ile virus lizisi ve sonra bir silis matriks ile kazanılmasına dayalı nükleik asitin pürifikasyonu (Boom ve

diğ., 1990; Lees ve diğ., 1994) veya alternatif olarak, pürifikasyon için organik çözücülerin kullanması ve sonra takip eden setiltrimetil amonyum bromit (CTAB) kullanılarak nükleik asitin presipitasyonu (Atmar ve diğ., 1995; Jaykus ve diğ., 1994) önerilen ve en çok kullanılan yöntemlerdir. Yine de ticari kitlerin geniş bir grubunda nükleik asitin pürifikasyonu zaten uygulanmıştır. Böyle kitler güvenilirlikle beraber kolaylık da sağlamaktadır (Loisy ve diğ., 2000; Schwab ve diğ., 2000; Shieh ve diğ., 1999).

Çevresel numunelerde virusların moleküler analizi inhibitörler, düşük virus konsantrasyonu ve sekans varyasyonu ile ilgili sorunları kapsayabilmektedir. Konsantrasyon-ekstraksiyon işlemi virusa özel olmadığından dolayı, farklı virusların nükleik asiti aynı zamanda ekstrakte edilebilmektedir. RT-PCR sıkı koşullarda uygulanmalı ve hibridizasyon ile doğrulanmalıdır. Bazen viral suşlarının karakterize edilmesi için amplifiye edilmiş sekansın analiz edilmesi gereklidir. Bu özellikle norovirus tespiti için önemlidir, çünkü noroviruslar geniş bir suş çeşitliliğine sahiptir. Çoğu izolat maymun böbrek hücre hattı (MA104) veya insan bağırsak hücre hattı (CaCo-2) gibi (Kitamoto ve diğ., 1991) birkaç hücre hattında üremeye uyartılabilmesine rağmen, yabancı tip rotavirusları, *in vitro* replikasyonlarında zorluklar göstermektedirler. Spesifik enfeksiyöz rotavirusların teşhisi için standart metotlar, immunofluoresan testleri ve kültürdeki enfekte odakların optik mikroskopik sayımını içermektedir (Bosch ve diğ., 1988; Hejkal ve diğ., 1981; Smith ve Gerba, 1982). Rotavirusla enfekte hücrelerdeki floresan odakların tespiti için akış sitometrisinin (flow cytometry) kullanılması, bu yöndeki diğer bir gelişmedir (Abad ve diğ., 1998). Standardize edebilen ve otomatikleştirebilen bir prosedür vasıtasıyla, rotavirusları çevresel numunelerde saptanmak için akış sitometrisi uygulanabilmektedir. Böyle bir prosedür doku kültürlerinde floresan odakları tespit etmek için direkt optik mikroskobiden daha az hantaldır (Bosch ve diğ., 2009).

2.3.1. Virus elüsyonu ve konsantre edilmesi

Kabuklu deniz hayvanları normalde düşük virus konsantrasyonları içermektedir. Bu nedenle, PCR analizinden önce virusları kabukluların dokusundan verimli biçimde elde edebilen özel laboratuvar tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Böyle bir işlemde başlıca uygulanan aşamalar genelde virusun kabuklu deniz hayvanlarının dokusundan elüsyonu, virus parçacıklarının yeniden elde edilmesi ve sonra virusun

konsantre edilmesini kapsamaktadır. Bazı metotlarda virus elüsyonundan önce asidik adsorpsiyon uygulanmakta ancak metotların çoğu için viruslar farklı tamponlar (örneğin kloroform-butanol ve glisin) kullanılarak ayrıştırılmaktadır. Elüsyondan sonra viruslar polietilen glikol presipitasyonu veya ultra-santrifüjleme vasıtasıyla konsantre edilmektedir (DePaola ve diğ., 2010; Terio ve diğ., 2010; Bosch ve diğ., 2011).

Virusun gıdalardan bir elüsyon prosedürü ile ayırt edilmesi birçok numune işleme protokollerinde birinci aşama olarak sayılmaktadır. Yüzeysel olarak kontamine olmuş gıdalarda, virus basit bir şekilde bir tuz solüsyonu veya glisin tamponu ile hafifçe yıkama vasıtasıyla ayrıştırılabilmektedir (Schwab ve diğ., 2000; Jean ve diğ., 2004; Le Guyader ve diğ., 2004). Başka durumlarda, gıdalar elüsyon prosedüründen önce homojenize edilmektedir. Ondan sonra virus ya direkt elüsyon prosedürü ya da adsorpsiyon-elüsyon metodu kullanılarak doğrudan gıdadan ayrıştırılabilmektedir (Atmar, 2006).

Direkt elüsyon protokollerinde glisin ve sodyum klorit, borat ve et suyu, tuz ve et suyu ve sadece et suyu gibi çeşitli solüsyonlar ve tamponlar başarıyla kullanılmıştır (Lees ve diğ., 1994; Traore ve diğ., 1998; Leggitt ve Jaykus, 2000; Sair ve diğ., 2002; Le Guyader ve diğ., 2004). Sadece birkaç çalışmada farklı elüsyon tamponları karşılaştırılmış ve bu çalışmalar glisine dayalı tamponların diğer test edilmiş solüsyonlarından daha iyi olduklarını ortaya koymuşlardır (Traore ve diğ., 1998; Le Guyader ve diğ., 2004). Organik flokülasyon ve polietilen glikol orijinal olarak infektivite analizlerinde kabuklu deniz hayvanlarından elde edilen virusların konsantre edilmesi için kullanılmıştır (Williams ve Fout, 1992). Polietilen glikol 6000 (PEG-6000) farklı virus türlerini konsantre edebilmekte (Lewis ve Metcalf, 1988) ve PEG-8000'den direkt karşılaştırmasında daha iyi performans göstermiştir (Traore ve diğ., 1998; Atmar, 2006).

2.3.2. Moleküler saptama yöntemleri

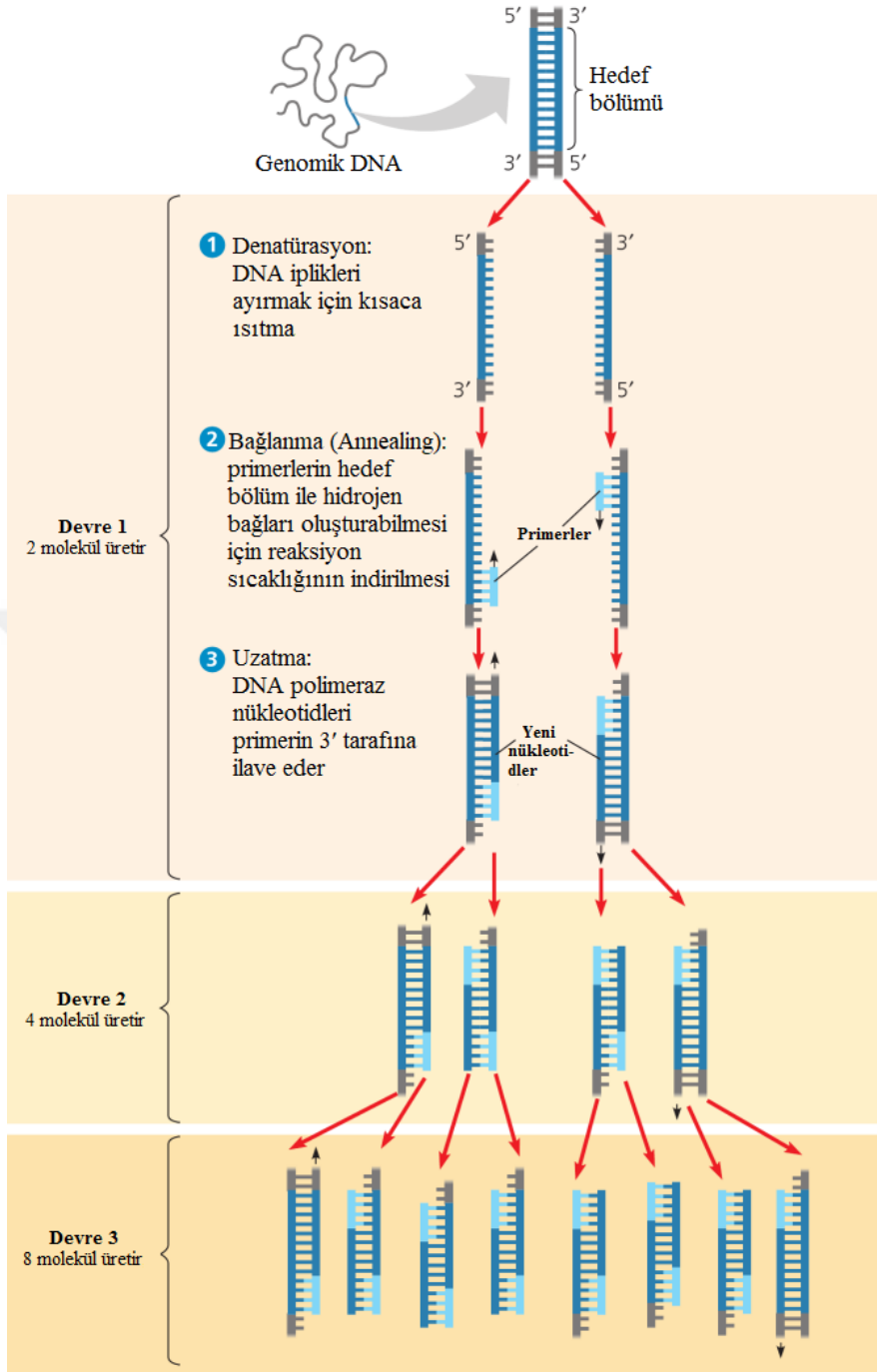
Moleküler teknikler, özellikle RT-PCR, gıda ve çevresel numunelerde sağlık açısından önemli virusları belirlemek için mükemmel gereçleri sağlamaktadır. Ciddi sağlık riski taşıyan viruslar önceden saptanamazdı, çünkü doku kültürlerinde kötü veya hiç çoğalamazlar, ancak şimdi nükleik asite dayalı tekniklerinin sayesinde tespit edilebilmektedirler (Bosch ve diğ., 2009).

2.3.2.1. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA polimeraz enzimi kullanarak bir DNA kalıbı amplifiye etmektedir. Bu kimyasal reaksiyonun ana bileşenleri, DNA polimeraz, eşit molar konsantrasyonlarda deoksiribonükleotid trifosfatları (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iki oligonükleotid primerlerin molar fazlalığı ve uygun bir tampondur. Oligonükleotid primerleri hedef kalıbın zıt tarafların üzerinde olan dizileri ile tamamlayıcıdır. PCR reaksiyonu üç temel aşaması oluşturur ve bu aşamalar değişen sayıda devreler boyunca tekrarlanırlar: (1) ısı denatürasyonu, (2) primer bağlanması (annealing), (3) primer uzatması. İlk adımda çift zincirli DNA ısıyı kullanarak denatüre edilir (92-95°C) ve tek zincirli DNA'ya dönüştürülür. Bundan sonra reaksiyonun sıcaklığı 40-60 °C'ye süratle düşürülür. Bu sıcaklık aralığında oligonükleotid primerleri kalıptan çok daha yüksek konsantrasyonda bulduklarından dolayı tercihli olarak tek zincirli kalıp ile bağlanmaktadır. Üçüncü aşamasında DNA polimeraz kalıbın sırasıya tamamlayıcı olan nükleotidleri primerin 3' tarafına ilave etmektedir. Bu aşaması, 70-75°C arasında, DNA polimerazın enzimatik aktivitesi ile optimum olan sıcaklığında meydana gelmektedir (Atmar, 2006). Şekil 2.6'da PCR prosedürü gösterilmektedir (Giri, 2015).

Her devrede tüm üç aşama (ısı denatürasyonu, primer bağlanması ve primer uzatması) tekrarlanmaktadır. Reaksiyon mutlak verimliliğiyle devam edilir ise, amplifiye edilmiş DNA'nın miktarı her devreden sonra çiftlenmektedir. Dolayısıyla, 20 devreden sonra hedef DNA bölümü yaklaşık bir milyon (2^{20}) kat amplifiye olmaktadır. Pratikte, PCR amplifikasyonun verimliliği idealdan daha az olmakta, devre sayısı arttıkça azalmaktadır. PCR analizinin başlangıçtaki tarifinde termolabil DNA polimeraz (*Escherichia coli* DNA polimeraz klenow fragmanı) kullanılmış ve bu nedenle her ısı denatürasyon aşamasından sonra enzimin değişmesi gerekmiştir (Saiki ve diğ., 1985).

Bir termostabil DNA polimeraz belirledikten sonra, enzimin her devreden sonra etkisiz hale gelmesi önlenmiş ve programlanabilir ısı döngüleyici (thermocycler) kullanılarak amplifikasyon reaksiyonunun otomatikleştirilmesi mümkün olmuştur (Saiki ve diğ., 1988). İlk Taq polimeraz elde edildikten sonra, fazla termostabil DNA polimerazlar tanımlanmıştır. Bazı yeni termostabil DNA polimerazları Taq polimerazdan daha yüksek doğruluğa (daha düşük hata oranı) sahip olmaktadır (Cline ve diğ., 1996; Atmar, 2006).



Şekil 2.6 PCR prosedürü (Giri, 2015)

2.3.2.2. RT-PCR

RNA-PCR da denilen, revers transkripsiyon-PCR (RT-PCR), PCR reaksiyonun modifikasyonu olarak tanınmaktadır. RT-PCR kullanarak bir RNA kalıbı amplifiye edilebilmektedir. Reaksiyonun ilk aşamasında bir tamamlayıcı DNA (cDNA) üretilip, PCR vasıtasıyla yukarıdaki aynı aşamalarıyla amplifiye edilmektedir. cDNA'nın üretim aşamasında deoksiribonükleotid trifosfatlar, bir oligonükleotid primer, uygun bir tampon ve revers transkriptaz faaliyetine sahip olan DNA polimeraza ihtiyaç

duyulmaktadır. Oligonükleotid primeri kalıba özel (PCR reaksiyonu gibi) ya da rastgele heksamer veya oligo-dT olabilmektedir (amplifiye edilecek genetik bölümü poliadenile edilmiş bir bölgeye yakın olduğu zaman). Bir iki-aşamalı RT-PCR reaksiyonunda cDNA ayrı bir reaksiyonda üretilmektedir. Sonradan reaksiyonunun karışımının tümü veya bir kısmı PCR reaksiyonun karışımına ilave edilmektedir. Bir tek-aşamalı RT-PCR reaksiyonunda ise hem cDNA üretilmesi hem de PCR amplifikasyonu için tüm gerekli olan bileşimler aynı zamanda eklenmektedir (Atmar, 2006).

RT-PCR analizlerin çoğu avian miyeloblastoz virusu (AMV) reverse transkriptazı veya moloney murine lösemi virusu (MMLV) reverse transkriptazı gibi ısıya dayanıksız revers transkriptazı kullanılmakta ve dolayısıyla cDNA'nın üretim aşaması düşük sıcaklıkta (<50°C) yapılmaktadır. Hem reverse transkriptaz hem de DNA polimeraz faaliyetine sahip olan ve termostabil DNA polimerazın *Thermus thermophilus*'tan gelişmesinin sayesinde, RT-PCR analizi için tek bir enzimin kullanması mümkün olmuştur (Myers ve Gelfand, 1991). Bu enzim kabuklu deniz ürünlerinde norovirusları saptanmak için yapılan analizleri ile başarıyla birleştirilmiş ve virus saptanmasının limitleri Taq polimeraz kullanılan analizlerle benzemektedir (Schwab ve diğ., 2001). Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalar bu enzimin, Taq polimeraz ile başarıyla kullanılabilen ve belirli primer çiftleriye sahip olan virus genomunu yeterli şekilde amplifiye edilmesinde başarısız olduğunu ortaya koymuşlardır (Atmar, 2006).

2.3.2.3. Real-time PCR

Gerçek zamanlı (Real-time) PCR, özgünlük doğrulama testlerinde ampikonların PCR sonrası manipülasyon ihtiyacını ortadan kaldırarak ve çapraz kontaminasyon riskini azaltarak analitik prosesin etkinliğini azaltır. Dezavantajlar ekipmanların masrafları (ısı döngüleyici (thermalcycler) ve ampikon saptanma ekipmanları), multiplex analizleri uygulamak için sınırlı kabiliyeti ve ampikonun boyutu izleme yetersizliğini kapsamaktadır (Mackay ve diğ., 2002). Amplifiye edilmiş ürünleri tespit etmek için iki başlıca yaklaşımı bulunur: DNA'yı bağlayan florofofların kullanılması (florofoflar boyaları) ve belirli oligoprofların kullanılması. Florofoflar çift zincirli DNA'nın içine girer ve ışığın belirli dalga uzunluğuna maruz kaldıktan sonra floresan yansına verir. SYBR yeşil en çok kullanılan florofoflardır, ancak ethidium bromit ve YO-PRO-1 de

kullanılmaktadır. Daha yüksek çözünme sıcaklıklarına sahip olan virusa özel amplikonları özgül olmayan primerler ve dimerlerinden ayırt etmek için bir erime noktası analizi kullanılmaktadır. Özellikle hedef düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman (kontamine olmuş gıdalarda gibi), floroforlar, ilk PCR aşamalarında meydana gelen ve özgün olmayan amplifikasyondan kaynaklanan amplikonları tanımlayamamaktadır. Bunun sonucu olarak amplikonu tespit etmek için floroforların kullanılabilirliği sınırlı kalmaktadır. Gerçek zamanlı PCR analizlerinde özgün amplikon saptanmak için, floresan ile işaretlenmiş oligoproblar başlıca araçlar olarak kabul edilmektedir. En yaygın kullanılan iki metotta, raportör floroforu ve söndürücü (quencher) floroforu ile iki yönlü işaretlenmiş oligoprobları kullanılmaktadır. (Mackay ve diğ., 2002; Atmar, 2006).

2.3.2.4. Multiplex PCR

Multiplex PCR analizinde, farklı hedef kalıpları tek bir tüpte amplifiye etmek için iki ya da daha fazla primer çiftleri kullanılmaktadır. Bu yöntem tek bir reaksiyon ile çeşitli virus türlerin varlığını belirlenebilmektedir. Yine de her hedefi etkili biçimde amplifiye edilebilmek için farklı hedeflerin primerleri benzer bağlanma (annealing) sıcaklıklarına sahip olmalı ve tamamlayıcılığı eksik olmalıdır (Atmar, 2006).

Moleküler tekniklerin bir sınırlaması da onların enfeksiyöz olan ve olmayan parçacıkların ayırdedebilmesinde başarısız olduklarından. Bu hakikat çevre virolojisinde kritik bir şekilde ilişkili olabilmektedir (Abad ve diğ., 1994; Gassilloud ve diğ., 2003). Ancak, birkaç sorun göz önünde bulundurulmalıdır. Halık sağlığı açısından önemli olan enterik virusların çoğu RNA genomları taşımaktadır. RT-PCR kullanılan çalışmalarda, poliovirusun genomik RNA'sının sterilize edilmemiş deniz sularında nonstabil olduğu gösterilmiştir (Tsai ve diğ., 1995). Serbest DNA oldukça stabilken, norovirus veya hepatit A virusu gibi tek zincirli RNA genomunun deniz ortamında kendi protein kılıfı olmadan stabil kalabilmesi olanaksızdır. Bu tahmin rotavirusun çift zincirli RNA genomu için daha az biçimde anlaşılmaktadır (Bosch ve diğ., 2009).

Antikor bağlayan RT-PCR, enfeksiyöz virusların moleküler geri kazanılması için kullanılabilir. Bu yaklaşım kabuklularda hepatit A virusunun tespit edilmesinde uygulanmış ve hem sensitif hem de RT-PCR inhibitörleri uzaklaştırmak için faydalı olduğu gösterilmiştir (Deng ve diğ., 1994; Graff ve diğ., 1993; López-

Sabater ve diğ., 1997). Parçacık yapısının değiştirildiği zaman yapısal bağımlı monoklonal antikoru vasıtasıyla tanımlanması kaybolmaktadır. Moleküler yöntemde bu tür antikoru kullanılmasıyla, sağlam ve değişmiş viryonların ayırılması mümkün olabilmektedir. En çok anlamlı virus patojenleri için yeterli immünolojik ayrımları mevcut olmakla birlikte bu yaklaşım diğer enterik viruslar için de faydalı olabilmektedir. Bu amaçla, in vitro ekspresyon sistemlerinde yüksek sayılarda elde edilebilen rekombinant virus gibi parçacıklar (Crawford ve diğ., 1994; Lawton ve diğ., 1997; Caballero ve diğ., 2004), kültüre edilemez virusların antikorlarının üretimi için kullanılabilir. Yeni gelişmelerin sayesinde norovirusun antijenik saptanmasına dayalı metotları tanımlanmıştır (Tian ve Mandrell 2006, Colquhoun ve diğ. 2006). Ancak norovirusun yüksek çeşitliliği bu metotların özgünlük ve duyarlılığı sınırlayabilmektedirler (Zheng ve diğ. 2006; Bosch ve diğ., 2009).

2.4. Gıdalarda enterik virus varlığı hakkında yapılan çalışmalar

Güney İtalya'da yapılan bir çalışmada, Akdeniz midyesinde (*Mytilus galloprovincialis*) farklı gıda kaynaklı virusların prevalansı araştırılmıştır. Toplam 108 midye numunesi iki yıl boyunca (2014 yılında 25 midye grubu, 2015'te ise 83 midye grubu) toplanıp, Real-time reverse transkripsiyon PCR kullanılarak incelenmiştir. Her bir numune için ortalama on adet midyeden sindirim dokusu (hepatopankreas) çıkarılarak birleştirilmiş ve analiz edilmiştir. Aranan viruslar human norovirusu (genogrup I ve II), rotavirus, astrovirus, sapovirus, aichivirus, hepatit A virusu ve hepatit E virusu kapsamaktadır. Toplam numunelerin %50,93'ünün aranan viruslardan en az birisi ile kontamine olduğu ortaya koyulmuştur. Analiz edilen ilk 25 midye numunesinin sapovirus (%16,00), astrovirus (%16,00) ve aichivirus (%8) pozitif olduğu saptanmıştır. İkinci yıl (2015) toplanan 83 numunenin astrovirus (%32,53), norovirus GII (%26,50), sapovirus (%18,07), hepatit A virusu (%16,87), rotavirus (%16,87), aichivirus (%13,25) ve norovirus GI (%12,05) pozitif olduğu saptanmıştır (Fusco ve diğ., 2017).

Haziran 2012 – Mayıs 2013 tarihleri arasında, Brazilya'da kıyı lagünlerinden yüz adet (n = 100) pembe karides (*Farfantepenaeus paulensis*) örneği ve 48 su numunesi toplanmış ve su örnekleri konsantre edilmiştir. Karidesler püre haline getirilmiş ve her karidesten ortalama bir gramlık örnek analiz için kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra örnekler, viral genomları tespit etmek ve ölçmek için gerçek

zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile analiz edilmiştir. Human (HAdV), canine (CAdV), bovin (BAdV), avian (AvAdV) ve porcine (PoAdV) adenovirusu (AdV) pan-specific adenovirus primerleri kullanılmıştır. Karides örneklerinin %35'i, baskın olarak avian adenovirus olmak üzere, kontaminasyon için pozitif, su numunelerinin toplam %91,7'sinde human adenovirusu en çok görülen olmak üzere adenovirusun DNA'sı bulunmuştur ve karidesdeki adenovirusların önemli miktarda biyoakümülyasyona uğradığı ortaya koyulmuştur. Toplanan karideslerde AvAdV %17, BAdV %13, CAdV %7 ve PoAdV %2 oranında tespit edilmiştir. HAdV hiçbir karides numunesinde saptanmamıştır. Alınan 48 su numunesinin 44'ünde (%91,7) adenovirus tespit edilmiştir. AvAdV'un yüksek oranda tespit edilmesinin nedeninin göllerin çevresinde çok sayıda broyler çiftlikleri ve lagün sistemindeki zengin yabani kuş çeşitliliği ve sayısı olduğu düşünülmüştür. Toplanan su örneklerinde HAdV %64,6, BAdV %47,9, AvAdV %10,4, CAdV %8,3 ve PoAdV %8,3 oranında saptanmıştır. Güney Brezilya'daki örneklerin toplandığı gölleri kuzey kıyılarında yer alan şehirlerin, yüksek şehirleşme ve yoğun tarımsal faaliyet ve kötü kanalizasyon arıtma ve dağıtım sistemine sahip olduğu belirtilmiştir (Luz ve diğ., 2015).

Hindistan'da kabuklu deniz hayvanlarında rotavirus varlığını saptamak için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada toplam 200 kahverengi midye, sarı ve siyah deniz tarağı Ekim 2010 ve Şubat 2012 tarihlerinde güney Hindistan'daki Kerala'nın Kollam ve Trivandrum'un farklı yerlerinden toplanıp analiz edilmiştir. Ön işlemden sonra virus konsantrasyonu için proteinaz K kullanılmış ve RNA izolasyonu fenol kloroform metodu kullanılarak yapılmıştır. Aranan virus RNA'sının varlığı RT-PCR ile saptanmıştır. Toplam 200 midye ve deniz tarağı numunesinden 5 numunenin (%2,5) pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Rotavirus 60 kahverengi midye numunesinden 2 numunede (%3,33), 70 sarı deniz tarağı numunesinden 2 numunede (%2,86) ve 70 siyah deniz tarağı numunesinden bir numunede bulunmuştur (Mohan ve diğ., 2014).

Çin'de on şehirden toplanan 162 kabuklu deniz hayvanı numunesinde (127 deniz tarağı (*Macra chinensis*, *Macra Veneriformis*, *Dosinia Japonica*, *Dosinia biscocta*, *Paphia undulata*, *Paphia euglypta*, *Ruditapes philippinarum*, *Sinonovacula constrictai*, *Solen grandis*, *Scapharca subcrenata*, *Scapharca labiosa*, *Tegillarca granosa*, *Pecten farreri*, *Pecten yesoensis*), 18 midye (*Mytilus edulis*, *Perna viridis*) ve 17 istiridyeye (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea plicatula*) olmak üzere) farklı enterik virusların varlığını saptanmıştır. Aranan enterik viruslar hepatit A virusu (HAV), norovirus

(NV), rotavirus (RV), poliovirus (PV), astrovirus (AsV) ve adenovirusu (AdV) kapsamaktadır. Çalışmada virus elüsyon ve konsantrasyonu için glisin tamponu ve ultra-santrifüj metotları; ayrıca nukleik asit izolasyonu için hazır test kitleri kullanılmıştır. Kabuklu deniz hayvanlarında aranan enterik virusların varlığı RT-PCR metodu kullanılarak saptanmıştır. İncelenen her bir numune için kabuklu deniz hayvanlarından 500 gram alınmıştır. Çalışmanın sonucunda PV %15 (25/162 oranında) bulunmuş ve en çok rastlanan virus türü olduğu ortaya çıkarılmıştır. Takip eden NV numunelerin %12'sinde (20/162 numunede), AdV %9 (15/162 numunede), RV %7 (10/162 numunede), AsV %6 (9/162 numunede) ve HAV %5 (8/162 numunede) oranında rastlanmıştır. Bu çalışmada incelenen toplam 18 midye numunesinin hiçbirinde rotavirus ve adenovirus bulunmamış, ancak 1 adet midyede AsV, birer adet midyede HAV ve NV tespit edilmiştir. Ayrıca, RV haricinde, PV numunelerde bulunan diğer virus türleriyle önemli korrelasyon gösterilmiştir. Dolayısıyla oral polio aşısı kullanılan ülkelerde poliovirus insan enterik viruslarının bulaşmasının bir indeksi olarak kullanılabilmekte ve kabuklu deniz hayvanlarının güvenliğinin izlemesi son derece önem taşımaktadır (Xia Ming ve diğ., 2013).

Güneybatı Hindistan kıyılarının dışkı ile kontaminasyon derecesini değerlendirmeyi hedefleyen bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada 100 numune istiridye (*Crossostrea madrasensis*), 74 numune deniz tarağı (*Meritrix meritrix*) ve 20 numune karides (*Penaeus monodon*), toplam 194 numune olmak üzere enterovirus, adenovirus, norovirus ve hepatit A virusu saptamak için analiz edilmiştir. Her bir numune için 20 istiridye, 30 deniz tarağı ve 10 karides'in sindirim dokuları çıkarılarak tek bir numune olacak şekilde birleştirilmiş ve RT-PCR ile analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda istiridye numunelerinin %17'sinin adenovirus ve %37'sinin enterovirus ile bulaşmış olduğu saptanmıştır. 74 deniz tarağı numunesinde adenovirus %27 (20 tane) ve enterovirus %46 (34 tane) oranıyla bulunmuştur. Bütün istiridye ve deniz tarağı numuneleri hepatit A virusu ve norovirus için negatif çıkmıştır. İncelenen karides numunelerin 3 tanesi (%15) enterovirus için pozitifken, tüm aranan diğer virusları için negatif sonuç vermiştir (Umesha ve diğ., 2008).

Avustralya'da Queensland bölgesinde istiridye tüketilmesi ile ilişkili olan bir norovirus gastroenteriti salgını saptanmıştır (Stafford ve ark., 1997). Doksan yedi saptanan vakadan 92'sinde hastalar üç gün önce çiğ istiridye tükettiklerini onaylamışlardır. Kirkland ve diğerlerine göre (1996) yenilen ıstiridiye sayısı arttığında

hastalık riski de artmakta ve virusların etkisiz hale getirilmesi ve hastalığın önlenmesi için istiridiyenin buharlanması bile yetersiz kalmaktadır.

Başka bir çalışmada, kuzey Tunus'ta, Temmuz 2000 – Eylül 2001 arasında, numune toplamak için iki yer belirlenmiş ve her belirlenen yerden iki toplama noktasından toplanan, toplam 23 numunede (altı adet midye ve 17 deniz tarağı) astrovirus (AsV), enterovirus (EV), norovirus (NV) ve hepatit A virus (HAV) varlığını tespit edilmiştir. Bu çalışmada viruslar kabuklu deniz hayvanların sindirim dokusundan ayrıştırarak polietilen glikol presipitasyonu ile konsantre edilmiştir. Her analiz için kabukluların sindirim dokuları çıkarılıp, analizde 1.5 gramlık homojenize edilmiş sindirim dokusu kullanılmıştır. Nükleik asitlerin ekstaksiyondan sonra virus varlığı reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) vasıtasıyla saptanmıştır. Toplam 23 numunenin %83'ünü en az bir virus türü için pozitif olduğunu ortaya koyulmuştur. Astrovirus numunelerinin %61'inde, norovirus numunelerinin %35'inde ve HAV numunelerin %26'sında saptanmıştır. Enterovirus ise şaşırtıcı bir şekilde sadece bir numunede rastlanmıştır. İncelenen 6 midye numunesinin bir adedinde sadece astrovirus, bir adedinde sadece norovirus, bir adedinde EV ve NV, bir adedinde de hem HAV hem de NV saptanmıştır. Bu çalışma farklı üretim alanlarından toplanan kabuklu deniz hayvanların numunelerinin incelemesinin önemine dikkati çekmektedir. Kontaminasyonu onaylayan sonuçlar bütün kabuklu hayvanları üreten ülkelerde uygun araştırma ve izlemenin geliştirilmesini gerektirmektedir (Elamri ve diğ., 2006).

Kabuklularda enterik virusun yayılmasını analiz etmek için eş zamanlı bir şekilde Avrupa'nın birçok coğrafi bölgesinde geniş kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Çalışma kapsamında 475 (*Mytilus edulis*) mavi midye numunesi dört farklı ülkeden toplanmış (Yunanistan - 144 numune; İspanya – 104 numune; İsveç – 54 numune ve İngiltere – 173 numune) ve human adenovirusu, norovirus, enterovirus ve hepatit A virusu varlığını saptamak için incelenmiştir. Numuneler özel midye yetiştirme bölgelerinden alınmıştır. Yunanistan'dan alınan 144 numunede adenovirus %33, enterovirus %15, hepatit A virusu %4 ve norovirus GII %2 oranında saptanmıştır. İspanya'dan toplanan midye numunelerinin %36'sında adenovirus, %26'sında enterovirus, %3'ünde hepatit A virusu, %12'sinde norovirus GI ve %14'ünde norovirus GII tespit edilmiştir. İsveç'ten alınan midyelerde ise adenovirus %33, enterovirus %24, norovirus GI %17 ve norovirus GII %24 oranıyla bulunmuştur. İngiltere'den toplanan midye numunelerinin %46'sında adenovirus, %14'ünde enterovirus, %1'inde hepatit A virusu,

%5'inde norovirus GI ve %5'inde norovirus GII saptanmıştır. Birçok ülkede yapılan bu geniş kapsamlı çalışmasında alınan her bir numune 20 istiridye ve 20-30 midye içermiştir. Numunelerin sindirim dokusunu çıkarılarak 30 gram şekilde birleştirilmiş ve analiz edilmiştir. Bu çalışmada aranan viruslar sindirim dokusundan ayrıştırılmak için glisin tamponu kullanılmıştır (Formiga-Cruz ve diğ., 2002).

Hepatit A virusu (HAV), norovirus, enterovirus, rotavirus ve astrovirus varlığını belirlemek amacıyla, Ağustos 1995-Ağustos 1998 tarihlerinde, güney Fransa bölgesinden istiridye ve midye numuneleri aylık olarak toplanmıştır. Her numune en az 20 istiridye veya 30 midye içermiştir. Her bir midye ve istiridye numunesi için mide ve sindirim dokusundan 1.5 gramlık 3 parça çıkarılarak analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır. Toplanan kabuklu deniz hayvanları RT-PCR ile analiz edilmiştir. İstiridye numunelerinin midye numunelerinden daha az kirletilmiş olduğu ispatlanmıştır. İstiridye numunelerinin (toplam 108 numune) astrovirus %17, norovirus %23, enterovirus %19 ve rotavirus %27 pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Midye numunelerinde ise (toplam 73 numune) astrovirus %50, HAV %13, norovirus %35, enterovirus %45 ve rotavirus %52 tespit edilmiştir. Virus kontaminasyonu çoğunlukla kış aylarında izlenmiş, ancak farklı virus türleri arasında mevsimlik farklılıkları görülmüştür. Bu uzun süre boyunca uygulanan ve türünün ilk olan çalışmada rutin kabuklu hayvanların incelenmesinde moleküler tekniklerin fizibil olduğunu önermektedir (Le Guyader ve diğ., 2000).

Diğer bir araştırmada Norveç kıyısından 86 mavi midye (*Mytilus edulis*), at midyesi (*Modiolus modiolus*) ve istiridye (*Ostrea edulis*) numunesi toplanmış ve adenovirus varlığı numunelerinin %18,6 oranında saptanmıştır. Her bir numune 10-25 midye veya 5 istiridye içermiştir. Bu çalışmada virus ayrıştırılması için glisin tamponu kullanılmıştır. Pozitif numunelerin sayısı kış mevsiminde artmaktadır (Myrmel ve diğ., 2004).

Ayrıca, Muniain-Mujika ve diğerleri 2003 yılında İspanya'dan toplanan Akdeniz siyah midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) ve istiridyelerde (*Crassostrea gigas*) insana ait patojenik virusların varlığını araştırmışlardır. Virus ayrıştırılması için glisin tamponu kullanılmıştır. Adenovirusun numunelerin %47'sinde, enterovirusun numunelerin %19'unda ve hepatit A virusunun numunelerin %24'ünde bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bütün enterovirus ve hepatit A virusu pozitif numunelerin adenovirus için de pozitif olduğu gösterilmiştir. PCR ile saptanan human adenovirusların diğer

insan enterik viruslarının varlığı ile ilişkili olmakta, kabuklularda virus kontaminasyonunun moleküller indexi olarak faydalı olabilmektedir.

Karideslerin (*Penaeus schmitti*) enterik hastalıkların iletimindeki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, Venezuela'nın batısındaki topraklardan ve yerel deniz ürünleri satış yerlerinden ve doğrudan Maracaibo Gölü'nden toplam 33 karides örneğinden 16'sında (%49) polioviruslar 1 ve 2 ve echovirus türleri 20, 21, 27 ve 29 olmak üzere altı tür enterovirus izole edilmiştir. Bu çalışma sonuçları, enterovirusların kanalizasyon bulaşan deniz sularında bulunan karides popülasyonlarında mevcut olabileceğini göstermektedir (Botero ve diğ., 1996).

Türkiye'de ise bu konu üzerinde birkaç çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, Ağustos 2009 – Eylül 2010 tarihleri arasında İzmir Körfezi'nden toplanan 795 midyeden elde edilen 23 solungaç ve 30 sindirim dokusunda *Microsporidia spp.*, hepatit A virusu (HAV) ve norovirus (NV) kontaminasyonu araştırılmıştır. Patojenleri analiz etmek için direkt PCR, RT-nested PCR ve RT-booster PCR kullanılmıştır. Bu çalışmada incelenen bütün midye numunelerinin *Microsporidium spp.* için negatif olduğu ortaya çıkarılmıştır. 30 analiz edilen numuneden 8 (%26,7) HAV ve 9 (%30) NV için pozitif olduğu saptanmıştır. 23 analiz edilen solungaç numunesinden sadece bir tanesinde NV bulunmuştur. Kalan bütün solungaç numunelerinde araştırılan hiçbir virus türü bulunmamıştır. Çalışmanın sonucunda İzmir Körfezi'nde bulunan midyelerin HAV ve NV ile aşırı derecede kontamine olmuş olduklarını ortaya koyulmuştur. İzmir Körfezi'nden avlanan midyelerin çiğ veya az pişirilmiş şekilde tüketilmesi hastalığa neden olabilmektedir (Erol ve diğ., 2016).

Diğer bir çalışmada, Eylül 2008-Ağustos 2009 tarihleri arasında İstanbul'un Boğaz Bölgesi 'nden toplanan midye numunelerinde human norovirusu (NV) genogrup I ve II sıklığının belirlenmesini hedefleyen bir çalışma yapılmıştır. Boğaz kıyısındaki balık dağıtıcılarından toplam 110 midye numunesi toplanıp, Real-time RT-PCR ile analiz edilmiştir. Kontrol edilen 110 numuneden 5 numunenin (%4,5) NV genogrup II için pozitif olduğu, genogrup I için ise hiçbir numunenin pozitif olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre İstanbul Boğazı'ndan toplanan midyelerde NV genogrup II bulunmakta ve bu durum insan sağlığına risk oluşturmaktadır (Yılmaz ve diğ., 2010).

Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesi' ndeki Samsun İli'nden toplanan 600 midye, 60 numuneye bölünerek hepatit A virusu (HAV) varlığı saptamak için incelenmiştir.

HAV hücre kültürü enfeksiyonu metodu ve reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Virus elüsyonu için glisin tamponu kullanılmıştır. Her midye numunesi 10 adet midye içermiştir. Sonuçta kontrol edilen numuneden iki numunenin HAV için pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Bu sonuçlar HAV ile ilgilenen halk ve sağlık kurumları için faydalı olabilmekte ve HAV ile kirletilmiş olan kabuklu deniz hayvanlarının tüketilmesinden kaynaklanan virus salgınlarının önleminde önemli rol oynamaktadır (Terzi ve diğ., 2010).

İnsanlarda enterik virus enfeksiyonlarının insidansı hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Kore'de akut gastroenteritten muzdarip olan hastalarda human astrovirusu varlığı RT-PCR ve elektroforez yöntemi ile araştırılmıştır. Seul'de yerli hastanelerde bulunan 9597 ishali hastadan dışkı örnekleri toplanmıştır. Astrovirus %1 oranında (94 numunede) saptanırken, sapovirus %0,1 oranında (14 numunede) tespit edilmiştir. Yirmidokuz astrovirus pozitif hasta üzerinde yaş ve cinsiyete dayalı analizleri yapıldıktan sonra, astrovirusun 0 ve 14 yaş arasında hastalarda daha yaygın olduğu, astrovirus pozitif hastaların %69'u kadın olduğu ve bunların %69,2'si bebek olduğu; astrovirus pozitif hastaların %61,5'inin 1-4 yaş arasında olduğu ortaya koyulmuştur (Ham ve diğ., 2014).

Türkiye'nin doğu Anadolu Bölgesi'nde gastroenterit hastalığından muzdarip olan çocuklarında rotavirus ve adenovirus varlığı incelenmiştir. Çalışmada toplam alınan 1154 dışkı numunesi rotavirus ve adenovirus antijenlerini saptamak için immunkromatografik metotla incelenmiştir. Viral antijenler toplam 327 (%28,3) dışkı numunesinde bulunmuştur. Rotavirus pozitif numunelerin %73,7'sinde saptanırken, adenovirus pozitif numunelerin %26,2'sinde tespit edilmiştir. Rotavirus antijeni bütün yaş gruplarında yüksekken, iki yaş ve altı çocuklarında en yüksek oranında (%57,1) gözlenmiştir. Ayrıca, rotavirus enfeksiyonları kış mevsiminde %44,3 oranında ve sonbahar mevsiminde %24,6 oranında saptanmıştır (Ozsari ve diğ., 2016).

İstanbul'un Yeditepe Hastanesi'ne başvuran toplam 644 hastasında farklı akut gastroenterit ajanlarının varlığı analiz edilmiştir. Hastanenin pediatrik acil ünitesinden alınan dışkı numunelerinde rotavirus, norovirus ve adenovirusun varlığı kalitatif immunkromatografik analiz vasıtasıyla test edilmiştir. Rotavirusun, %12,7 oranıyla (75/588 numunede), en yaygın patojen olduğu saptanmıştır. Norovirus 51/520

numunede (%9,8) bulunmuş ve ikinci etyolojik ajanı olarak kabul edilmiştir. Adenovirus %4,7 oranında (28/594 numunede) tespit edilmiştir (Bicer ve diğ., 2014).

Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Acil Polikliniği'ne Ekim 2012-Ocak 2013 arasında akut ishale başvuran 126 çocuktan dışkı örnekleri alınmış ve ELİSA yöntemi kullanılarak rotavirus, adenovirus ve norovirus pozitifliği araştırılmıştır. Ayrıca, başvuran hastaların yaş, kardeş sayısı, toplu ortamda bulunma ve aşılama durumu sorgulanmış ve ateş, karın ağrısı, kusma ve ishal sıklığı ve süresi gibi klinik belirtileri kaydedilmiştir. Hastaların klinik ağırlık skorlamaları hesaplanarak etken viruslar arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Hastaların %18,2'sinde rotavirus, %10,3'ünde adenovirus ve %8,7'sinde norovirus saptanmıştır. Her üç virusun en fazla 1-5 yaş arasında gözlenmiştir. Norovirusun ortalama yaşı daha düşük saptanmıştır. Viral gastroenterit etkenlerinin ateş derecesi, ishal-kusma süresi ve sıklığı, dehidratasyon derecesi ve tedavisini oluşturan klinik skorlamasında her üç viral etken de orta derecede klinik ağırlığa sahipti. Adenovirusta kısmen daha ağır klinik skorlama saptanırken diğer ishal etkenleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Beş yaş ve altı çocuklarda rotavirus aşılama oranı ise %20 olarak saptanmıştır (Yılmaz, 2013).

Diğer bir çalışmada, İzmir'in Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde bulunan hastalardan dışkı numuneleri toplanıp, ticari immunkromatografik enzim immuno test kitleri kullanılarak, rotavirus ve adenovirusun varlığı araştırılmıştır. Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Enfeksiyöz Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarından Mayıs 2008 – Mayıs 2010 arasında toplanan toplam 1112 numunenin 201'i (18,07%) rotavirus ve 14'ü (1,2%) adenovirus antijeni için pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Toplam 610 numune erkeklerden ve 502 numune kadınlardan alınmıştır. Yaş aralığı 0-85 arasında değişiyordu. Toplam 821 dışkı numunesi 0-3 yaş arasındaki hastalarından toplanmıştır (Ece ve diğ., 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kabuklu deniz ürünleri

Derin su pembe karidesi (*Parapenaeus longirostris*) ve Akdeniz siyah midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) numuneleri Nisan (2017) ayının ilk 15 günü içinde İstanbul'un farklı yerlerinden toplanmıştır. Kabuklu hayvanlar taze, aynı günde avlanmış, dondurulmadan ve henüz canlıyken alınmıştır. Ayrıca, alınan hayvanlara herhangi bir kimyasal veya katkı maddesi uygulanmadığından emin olunmuştur.

Alınan numuneler bekletmeden, hemen toplandıktan sonra, steril ve filtreli Stomacher poşetlerine koyulup, soğuk koşullar altında laboratuvara getirilmiştir. Numune alma yeri ve miktarı çizelge 3.1'de görülmektedir.

Çizelge 3.1 Numune alma yeri ve miktarı

Alınan çeşiti	Alınan miktarı	Alınan yer
Karides	8 kg	Beylikdüzü - Gürpınar Su Ürünleri Hali (Balıkçı tekneleri)
Karides	3,2 kg	Büyükçekmece – Mimarşinan Balıkçı Barınağı (Balıkçı tekneleri)
Midye	500 adet	Beylikdüzü - Gürpınar Su Ürünleri Hali (Balıkçı tekneleri)
Midye	350 adet	Rumeli Kavağı – Taze balık satış dükkanları
Midye	500 adet	Beyoğlu – Lokantalar

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeleri

- %0,1 DEPC (Diethyl pyrokarbonat) RNase free su.
- Dezenfektan (Domestos ultra yoğun kıvamlı çamaşır suyu. CAS Numarası: 7681-52-9, Domestos/Unilever San. ve Tic. Türk A.Ş.). (Aktif maddenin adı ve miktarı: Sodyum hipoklorit %4,6. Yardımcı madde adları ve miktarları:

Çözücü (Su) %92,175, yüzey aktif madde %2,21, alkalinite sağlayıcı %0,9, parfüm %0,06, stabilizatör %0,05, köpük kesici %0,005).

- Dietyl pyrokarbonat (DEPC) (D5758 Sigma/Sigma-Aldrich - Almanya. CAS Number 1609-47-8, (EC Number 216-542-8), PubChem Substance ID 24893964).
- Etanol %96 (Antalya Alkollü İçecek San. ve Tic. A.Ş. – Türkiye).
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (BioUltra, anhidroz, ≥99% (titrasyon). (CAS Number 60-00-4 / EC Number 200-449-4). EDS-100G – Sigma-Aldrich – Almanya).
- Glisin GR for analysis – Merck Millipore – Almanya. ((CAS 56-40-6, EC Number 200-272-2, kimyasal formül: H₂NCH₂COOH). Katalog No. M104201 0100).
- Polietilen glikol 6000 for synthesis (PEG-6000) – (Merck Millipore - Almanya. CAS 25322-68-3, pH 5 - 7. Katalog No 8074911000).

3.1.3. Kullanılan laboratuvar cihazları

- Blender (Retsch GmbH – Almanya).
- Çok Yönlü Mini Santrifüj (Sigma 26-E Centrifuge – Almanya).
- Hassas terazi (Mettler Toledo – İsviçre, Model: ML204/01).
- İnkübatör/Shaking platform (Tmix – 220. Analytik Jena AG – Almanya).
- Real-time PCR Cihazı (Agilent Technologies-USA, Model: Mx3005P).
- Santrifüj (Sigma-Laborzentrifugen– Almanya, Model: 1-14).
- Santrifüj (Thermo Fisher Scientific, Laboratory Centrifuge – Almanya, Cat No. 75004230).
- Sınıf II Biyogüvenlik Kabini (Esco Santinel Gold – Microprocessor control system – Singapur, Model: LA2-4A1).
- Spektrofotometre (BioSpec-nano, Shimadzu Corporation Analytical & Measuring Instruments Division, Kyoto - Japonya).

3.1.4. Test kiti

- İnnuPREP Virus DNA/RNA izolasyon kiti, (845-KS4800050 – Analytik Jena – Almanya).
- PowerChek Adeno/Astro/Rota Real-time PCR Kiti (Ref No. R0211E, Kogene Biotech – Kore).

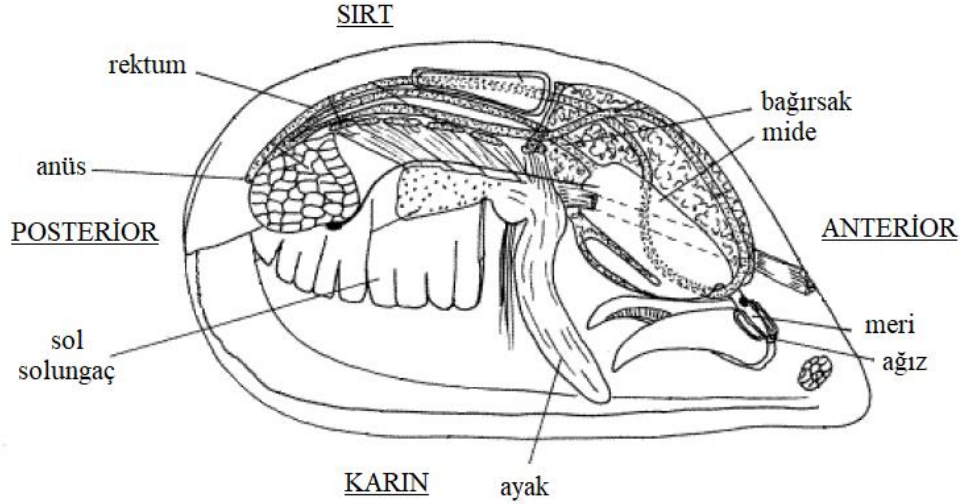
3.1.5. Diğer gereçler

- Buzdolabı (Arçelik KE98E160 – Türkiye).
- Derin dondurucu (Daihan WUF-500 – Kore).
- Pipet (Mettler toledo – Rainin – USA).
- Steril 1.5 ml ve 2.0 ml tüpler (LP Italiana SPA L111540 – İtalya).
- Steril eldiven (Beybi – Malezya).
- Steril RNase/DNase free 50 mL santrifüj tüpleri (Greiner bio-one – USA).
- Steril RNase/DNase free PCR kapak (Greiner bio-one – USA).
- Steril RNase/DNase free PCR tüp (Greiner bio-one – USA).
- Stomacher Poşeti (Steril tam filtrelili, Gosselin - France/GOFBAG-03. Full filter blender bag, FBAG-03, LOT-574763).
- Tek kullanımlı DNase/RNase free filtrelili pipet ucu (Capp ExPell Plus – Danimarka).

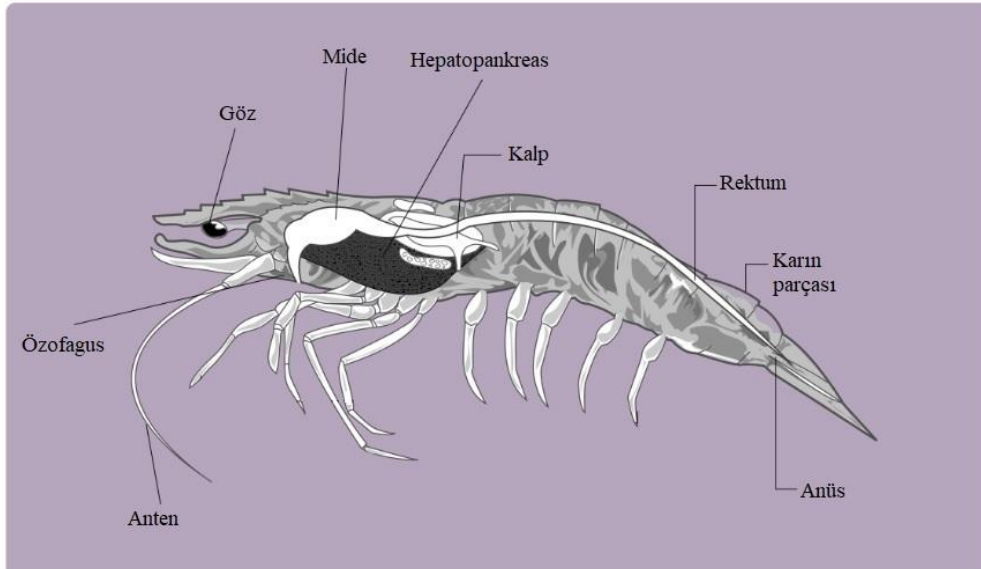
3.2. Yöntem

3.2.1. Numunelerin hazırlanması

Laboratuvara getirilen numuneler aseptik şartlarda temizlenip, sindirim dokusu çıkarılmıştır. Birçok yapılan çalışmayla, insan enterik viruslarının çoğunun kabukluların mide ve sindirim bezinde bulunduğu ortaya koyulmuştur (Abad ve diğ., 1997b; Romalde ve diğ., 1994). Bu organların çıkarılması virus nükleik asitlerinin izolasyonu kolaylaştırıp hızlandırırken, analiz edilen kabuklu hayvanın tane sayısı artırılarak testin duyarlılığı da artırılabilir (Atmar ve diğ., 1996; Bosch ve diğ., 2009). Bu nedenle her bir analiz için 18-22 gram sindirim dokusu çıkarılmış ve tek numune oluşturacak şekilde birleştirilmiştir (Xia Ming ve diğ., 2013; Terio ve diğ., 2010; Formiga-Cruz ve diğ., 2002; Kingsley ve Richards, 2001; Pina ve diğ., 1998). 18-22 gram numune için karidesten 400 gram, midyeden ise 25 adet işlenmiştir. Şekil 3.1 ve 3.2’de midye ve karidesin anatomisi gösterilmiştir (Mikkelsen ve Bieler, 2008; Diaz Rengifo, 2009).



Şekil 3.1 (*Mytilus edulis*) midyenin yan kesit görünümü (Mikkelsen ve Bieler, 2008)



Şekil 3.2 (*Litopenaeus vannamei*) karidesin anatomisi (Diaz Rengifo, 2009)

Beylikdüzü İlçesi'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden balıkçı teknelerinden alınan 8 kg karides numunesi 400 gramlık 20 partiye bölünmüş ve steril stomacher poşetlere koyulmuştur. Büyükçekmece'den Mimarsinan Balıkçı Barnağı'ndan teknelerden 3,2 kg karides numunesi alınmış ve 400 gramlık 8 partiye bölünerek stomacher poşetlere aktarılmıştır. Ayrıca, Beylikdüzü İlçesi'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden balıkçı teknelerinden alınan 500 midye numunesi, 25 adetlik 20 partiye bölünmüş ve steril stomacher poşetlere koyulmuştur. Rumeli Kavağı'ndan ticari taze balık satış dükkanlarından alınan 350 midye numunesi, 25 adetlik 13 partiye bölünmüş ve steril stomacher poşetlere aktarılmıştır. Beyoğlu İlçesi'nden lokantalardan alınan 500 midye numunesi, 25 adetlik 19 partiye bölünerek stomacher poşetlere koyulmuştur.

Çapraz kontaminasyonun önlenmesinden emin olmak için her bir numunenin işlenmesinde farklı bisturi ucu, steril çift eldiven ve steril alüminyum kağıt kullanılmıştır. Ayrıca, tüm numune hazırlanması ve analiz işlemleri İntertek Test Hizmetleri A.Ş. firmasının PCR laboratuvarı ve İstanbul Aydın Üniversitesinin Anadolu Bil Meslek Yüksek Okulunun Gıda Teknolojisi Programı Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.2.2. Numunelerin homojenizasyonu ve virus elüsyonu

Bu aşamada, Kingsley ve Richards (2001)'in metodu modifiye edilerek uygulanmıştır. Viruslar ilk olarak kabuklu deniz hayvanlarının sindirim dokusundan doğrudan ayrıştırılmıştır. Sonra da polietilen glikol ile konsantre edilmiştir. Direkt elüsyon için kabuklu deniz hayvanlarının sindirim dokusundan 18-22 gram 175 mL glisin tamponu ile (0,1 M glisin ve 0,3 M NaCl, pH 9,5) bir blenderde 3 dakika homojenize edilmiştir (Şekil 3.3; 3.4).

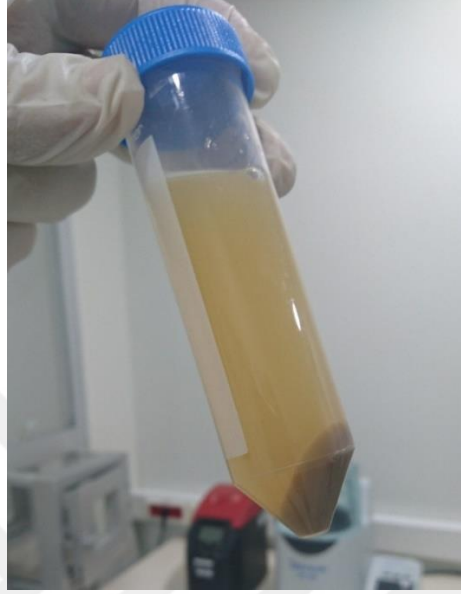


Şekil 3.3 Sindirim dokusu homojenizasyonu



Şekil 3.4 Sindirim dokusu homojenizasyonu

Sonra 40 mL homojenizata 7,000 x g, 4 °C’de 30 dakikalik santrifüjleme uygulanmıştır (Şekil 3.5). Homojenizasyon işleminden sonra blenderin kabı ve kapakları bir sonraki numuneyi işlemek için virüslara karşı etkin bir dezenfektanla yıkanarak (Domestos – Unilever San. ve Tic.) dezenfekte edilmiştir.



Şekil 3.5 Homojenizatın santrifüjlemesi

3.2.3. Virus konsantre edilmesi

Süpernatantta bulunan virus parçacıklar PEG-6000 kullanarak konsantre edilmiştir (Kingsley ve Richards, 2001; Atmar, 2006). % 16 PEG-6000 ve 0,525 M NaCl çözeltisi süpernatantın eşit hacimine ilave edildikten sonra, presipitasyon için buz üzerinde bir saat bırakılmıştır (Şekil 3.6; 3.7).

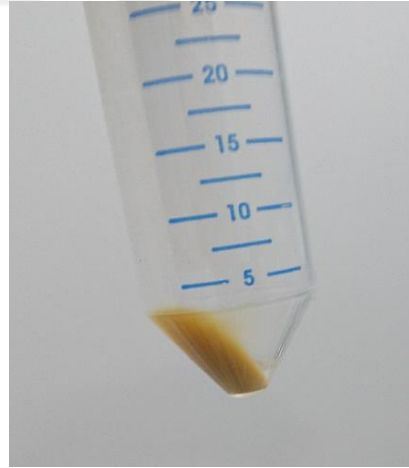


Şekil 3.6 Buz üzerinde presipitasyon işlemi



Şekil 3.7 Buz üzerinde presipitasyonu

Çöktürülen virüslere 7,000 x g'da 4 °C'de 10 dakika santrifüjleme uygulanmıştır. Pelet haline getirilen numuneler virus RNA/DNA izolasyonunda kullanılmak için 400 µL distile suda çözülüp, izolasyon işlemine kadar -30 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Elde edilen pelet

3.2.4. Viral DNA/RNA izolasyonu

Virus nükleik asitlerin izolasyonu için hazır test kitleri kullanılmıştır (İnnuPrep virus DNA/RNA izolasyon kiti-AnalytikJena-Almanya).

İnnuPrep virus DNA/RNA izolasyon kiti virus DNA ve RNA'sının farklı başlangıç maddelerinden izole etmek için tasarlanmıştır. İnnuPrep virus DNA/RNA kiti hücre

içermeyen sıvı biyolojik numunelerden (örneğin: plazma, serum, idrar, likör, hücre kültür süzüntüsü, katı maddeleri ve swab) son derece saf virus nükleik asitlerin hızlı hazırlanması için optimize edilmiştir.

Prosedür başlangıç maddesinin lizizi ve sonra gelen virus nükleik asitlerinin spin filtre yüzeyine bağlanması ile birleşmektedir. Birkaç yıkama aşamasından sonra virus nükleik asitleri RNase-free su kullanarak filtre zarından ayrıştırılmaktadır. İzolasyon kimyası ve prosedürü azami kazanç elde etmek için optimize edilmiştir. Ayrıca, kit Carrier Miks, Carrier RNA ve internal control DNA, RNA içermektedir.

İzole edilen nükleik asitler PCR, Real-time PCR veya her tür enzimatik reaksiyonu kapsayan uygulamalara uygundur.

Kullanılan kitin bileşenleri çizelge 3.2’de görülmektedir.

Çizelge 3.2 Virus RNA/DNA izolasyon kitinin bileşenleri

Bileşen	Miktar
Liziz solüsyonu CBV	25 mL
Bağlama solüsyonu SBS	120 mL
Carrier Miks	1 x liyofilize toz
RNase-free su	3 x 2.0 mL
Proteinaz K	1 x 1.5 mL çalışma solüsyonu için
Yıkama solüsyonu HS	15 mL (son hacim 30 mL)
Yıkama solüsyonu LS	16 mL (son hacim 80 mL)
Spin filtresi (mavi)	50 adet
Alıcı tüpler (2.0 mL)	5 x 50 adet
Elüsyon tüpler (1.5 mL)	50 adet
Manuel	1

İşleme başlamadan önce aşağıdaki adımları uygulanmıştır:

- Etanoldan 15 mL yıkama solüsyonu HS şişesine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Şişe her zaman sıkıca kapalı tutulmuştur.

- Etanoldan 64 mL yıkama solüsyonu LS şişesine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Şişe her zaman sıkıca kapalı tutulmuştur.
- Proteinaz K'ya 1.5 mL iki sefer distile su eklenmiş, çözündürülmüş ve uygun şartlarda muhafaza edilmiştir.
- Su banyosu ve RNase-free suya 70 °C'ye ön ısıtma yapılmıştır (Carrier Mix için önısıtılmış RNase-free suyu kullanılmaz).
- Bütün santrifüjleme aşamaları oda sıcaklığında uygulanmıştır.
- Başlangıç maddelerinin donma ve çözülmesinden kaçınılmıştır.

RNA DNA'dan çok daha az stabildir. Biyolojik maddelerin endojenöz RNAseler ve laboratuvarında her yerde devamlı olarak mevcut olan ekzojenöz RNAseleri tarafından parçalanmasına oldukça duyarlıdır. RNA hazırlanmasında tatmin edici sonuçları elde etmek için, ekzojenöz RNAselerle bulaşma imkânı, aşağıdaki kit manuelinden tavsiyelere göre, en ufak dereceye düşürülmüştür:

- Ciltten veya tozlu laboratuvar malzemelerinden RNase kontaminasyonu önlenmek için, araç ve RNA örnekleri kullanırken lateks veya vinil eldivenler giyilmiştir.
- Eldivenleri sıkça değiştirilmiş ve tüpler kapalı tutulmuştur.
- İzole edilmiş RNA buz üzerinde bırakılmıştır.
- İşlem süresi mümkün olduğu kadar kısa tutulmuştur.
- Prosedür boyunca steril ve tek kullanımlık polipropilen tüpler kullanılmıştır.
- RNase içermediklerinden emin olmak için, plastik kapaklar 0,1 M NaOH ve 1 mM EDTA (Etilenediaminetetraasetik asit) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kapaklar solüsyonla iyice çalkalandıktan sonra, RNase içermeyen su ile yıkanmıştır.
- Bütün cam eşyalar kullanmadan önce deterjanla temizlenip, iyice yıkanmış ve fırında 240 °C'de dört veya daha fazla saat ısıtılmıştır. Sadece otoklavlama RNAseleri tamamen yok etmez. Bununla beraber, cam eşyalar %0,1 DEPC (Diethyl pyrokarbonat) solüsyonu ile temizlenebilmektedir. Gerektiğinde cam eşyalar %0,1 DEPC solüsyonun içinde 37 °C'de 12 saat batırılıp, geri kalan DEPC uzaklaştırmak için 100 °C'de 15 dakika süresiyle otoklavlanmıştır.
- Bütün tamponlar DEPC'yle-işlenmiş RNase içermeyen su ile hazırlanmıştır.

- Bakteriyel kültürler, hücre kültürleri veya diğer RNase biyolojik kaynakları, içinde RNA pürifikasyonu uygulanan aynı laboratuvarında kullanılmamasına dikkat edilmiştir.
- Diğer işlemlerde kullanılan malzemeler, cam veya plastik eşyalar RNA izolasyonu için kullanılmamıştır.

Carrier Miks, carrier RNA ve internal kontrol DNA ve RNA (IC DNA/RNA) içermektedir. Çözünmüş carrier miks derhal liziz solüsyonu CBV'ye ilave edilmiştir. Carrier Miks -20 °C'de depolanmış ve 3 seferden daha fazla donma çözülme uygulanmamıştır. Liziz solüsyonu CBV ve Carrier Miks karışımı 4 °C'de bir gün süresiyle stabildir.

Her Carrier Miks tüpüne 1,25 mL RNase içermeyen su eklenir. Çizelge 3.3'te Liziz solüsyonu CBV ve carrier miks karışımının hazırlanması gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Liziz solüsyonu CBV/Carrier Miks karışımının hazırlanması

	5 numune	10 numune	n numune
Liziz solüsyonu CBV	2,4 mL	4,8 mL	480 µL x numune
Carrier Miks	60 µL	120 µL	120 µL x numune
Son hacim	2,46 mL	4,92 mL	492 µL x numune





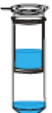





İzolasyon işlemi kit üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. İzolasyon işlemi için bir önceki aşamada hazırlanan konsantre edilmiş virusları içeren 400 µL'lik numune solüsyonları kullanılmıştır. Şekil 3.9'da izolasyon işlemi özetlenmiştir.

1- İlk aşamada 400 µL liziz solüsyonu/carrier miks (Lysis Solution CBV/Carrier Mix) 2 ml'lik reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. Aynı tüpe numuneden 400 µL ve 20 µL proteinaz K eklenip, kuvvetli vorteks ile 10 saniye karıştırıp, 70 °C'de 10 dakika inkube edilmiştir. Liziz verimini yükseltmek için, numune tüpleri inkübatör/shaking platform kullanılarak inkube edilmiştir. Lizizden sonra tüpün kapağından sıvıyı uzaklaştırmak için reaksiyon tüpleri kısaca santrifüjlenmiştir. (Bu aşamada kullanılan 2 ml tüplerin DNase/RNase içermediklerinden emin olmak için, kullanmadan önce 0,1 M NaOH ve 1 mM EDTA solüsyonu ve RNase içermeyen su ile yıkanmıştır).

2- Numuneye 800 µL bağlama solüsyonu (binding solution SBS) ilave edilip pipetlenerek karıştırılmıştır.

3- Elde edilen numuneden 650 µL 2 mL'lik alıcı tüpünde bulunan spin filtreye aktarılmıştır. Kapağı kapatılan tüp 10.000 x g (~12.000 rpm)'de bir dakika santrifüjleme uygulanmıştır.

4- Spin filtre yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldıktan sonra, kalan numune spin filtreye yüklenmiştir. Yeni tüpün kapağı kapatılarak 10.000 x g (~12.000 rpm)'de bir dakika santrifüjlenmiştir. Bundan sonra süzüntüyü içeren tüp atılarak, spin filtre yeni bir 2 mL'lik alıcı tüpe koyulmuştur.

1. Liziz			<ul style="list-style-type: none">400 µL CBV/Carrier Miks ve 20 µL proteinaz K eklenmesiVorteks : 10 saniyeİnkübasyon : 10 dakika (70 °C)kısaca santrifüjlenmesi
2. DNA/RNA bağlanması Yeni alıcı tüpü			<ul style="list-style-type: none">800 µL SBS eklenmesiVorteksSpin filtresinin alıcı tüptüye koyulması650 µL numune spin filtreye eklenmesi10.000 x g (~12.000 rpm): 1 dakikakalan numunesinin spin filtreye yüklenilmesi10.000 x g (~12.000 rpm): 1 dakika
3. Yıkama Yeni alıcı tüpü			<ul style="list-style-type: none">400 µL HS eklenmesi10.000 x g (~12.000 rpm): 1 dakika650 µL LS eklenmesi10.000 x g (~12.000 rpm): 1 dakika650 µL LS eklenmesi10.000 x g (~12.000 rpm): 1 dakika
4. Etanol uzaklaştırılması Yeni alıcı tüpü			<ul style="list-style-type: none">Süzüntüsünün atılmasıSpin filtresinin alıcı tüptüye koyulması10.000 x g (~12.000 rpm): 5 dakika
5. Elüsyon			<ul style="list-style-type: none">Spin filtresinin elüsyon tüptüye koyulması60 µL önısıtılmış RNase-free suyun eklenmesiİnkübasyon : 2 dakika (oda sıcaklığı)8.000 x g (~10.000 rpm): 1 dakika

Şekil 3.9 Virus izolasyon işlemi
(SBS: Bağlama solüsyonu; HS: Yıkama solüsyonu HS; LS: Yıkama solüsyonu LS)

5- Spin filtre açılıp, 500 µL yıkama solüsyonu HS (washing solution HS) eklenmiştir. Tüpün kapağı kapatıldıktan sonra, tüpe 10.000 x g (~12.000 rpm)'de bir dakikalık santrifüjleme uygulanmıştır. Süzüntüsü içeren tüpten alınan spin filtre yeni bir 2 mL'lik tüpe koyulmuştur.

6- Spin filtre açılıp, 650 µL yıkama solüsyonu LS (washing solution LS) ilave edilmiştir. Sonra tüpün kapağı kapatılıp, 10.000 x g (~12.000 rpm)'de bir dakika santrifüjlenmiştir. İçinde bulunan süzüntü tüpten uzaklaştırıldıktan sonra spin filtre yeni 2 mL'lik tüpe koyulmuştur.

7- Önceki aşamada olduğu gibi spin filtre açılıp, 650 µL yıkama solüsyonu LS (washing solution LS) ilave edilmiştir. Sonra tüpün kapağı kapatılıp, 10.000 x g (~12.000 rpm)'de bir dakika santrifüjleme uygulanmıştır. Süzüntü içeren tüp atıldıktan sonra spin filtre yeni 2 mL'lik tüpe koyulmuştur.

8- Bütün etanol kalıntısını uzaklaştırmak için 10.000 x g (~12.000 rpm)'de beş dakika santrifüjleme uygulanmıştır. 2 mL'lik alıcı tüpten uzaklaştırılmıştır.

9- Spin filtre 1,5 ml elüsyon tüpüne koyulmuştur. Spin filtrenin kapağı dikkatle açılıp, 60 µL ön ısıtılmış RNase içermeyen distile su (70 °C) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkube edildikten sonra, 8000 x g (~10.000 rpm)'de bir dakika santrifüjleme uygulanmıştır.

İşlemin sonunda elde edilen virus nükleik asitleri sonraki Real-time PCR aşamasında kullanılmıştır. Virus DNA/RNA'sı içeren tüpleri sonraki aşamasında kullanana kadar -30 °C'de saklanmıştır.

3.2.5. Multiplex Real-time PCR

Real-time PCR aşaması için hazır test kitleri kullanılmıştır (PowerChek Adeno/Astro/Rota Real-time PCR Kit-Kogene Biotech-Kore).

PowerCheck Adeno/Astro/Rota Real-time PCR kiti klinik örnekler ve çevresel numunelerden izole edilen adenovirus, astrovirus ve rotavirusun özel genlerinin saptanması için tasarlanmıştır. Bu kit Real-time RT-PCR reaksiyon tamponu, tek-adım RT-PCR enzim karışımı ve özel primer/prob seti içermektedir. Ayrıca, güvenilir sonuçları elde etmek için kitin içinde Internal Control (IC) bulunmaktadır.

Adenovirus, astrovirus ve rotavirus Real-time RT-PCR analizi vasıtasıyla saptanması, quadruplex bir Real-time RT-PCR analizidir. Bu analiz reverse transkriptaz ile cDNA

sentezi ve Taq kullanılan PCR amplifikasyonu kapsamaktadır. Tek bir tüpte DNA polimeraz ve floresan boya ile imlenmiş özel primer ve prob bulunmaktadır. Adenovirus, astrovirus ve rotavirusun özel genlerinin hedef sıraları ve internal control (IC), kanallar FAM, VIC (HEX), ROX ve Cy5 sırasıyla kullanarak tespit edilmektedir.

İlk aşamada, RNA PCR'ın direkt kalıbı olmadığı için, cDNA reverse transkriptaz ile RNA'dan sentezlenmektedir. Reverse transkripsiyon boyunca DNA polimeraz tamamen etkisiz olur ve reverse transkriptaz reaksiyonuna engel olmamaktadır. PCR amplifikasyon aşamasında primer ve prob karışımı TaqMan denilen prensipten faydalanmaktadır. PCR amplifikasyon sırasında ileri ve ters primerleri PCR kalıbı olarak cDNA'ya hibridize etmektedir. Reaksiyonun sonunda elde edilen floresansın yükseltmesi farklı Real-time PCR platformları ile tespit edilebilmektedir.

Elektroforezden farklı olarak, Real-time PCR esnasında floresansın yoğunluklarının izlemesi, PCR'dan sonra reaksiyon tüpleri tekrar açmadan, çoğalan ürünün belirlenmesine izin vermektedir. Tek-adım Real-time PCR kiti, reverse transkripsiyon ve PCR amplifikasyon aşamaları arasında hiç ekstra araç kullanmadan, hedef gen bölgelerini saptayabilmektedir. Bu nedenle, numunelerin kontaminasyon riski en düşük dereceye küçültülmektedir.

Bunun yanı sıra, kit PCR inhibisyon kontrolü olan ekzojenoz pozitif kontrolü (EPC) içermektedir. IC kullanıcının PCR inhibisyonunu belirlemesi ve kontrol etmesine izin vermektedir. IC primer/prob karışımının içinde bulunmaktadır. Ayrıca, onun ayrı olarak uygulanması gerekmemektedir. IC her amplifikasyon reaksiyonuna eklenip, numunenin hedef DNA'sıyla beraber genişletilmektedir. Elde edilen sonuçları Cy5 kanalında görülebilmektedir.

Real-time PCR kitin bileşenleri aşağıdaki gibidir:

- Primer/prob karışımı (Adeno/Astro/Rota): quadruplex primer/probe karışımı adenovirusun özel primer/prob, astrovirusun özel primer/prob, rotavirusun özel primer/prob, IC özel primer/prob ve IC için DNA içermektedir.
- 2x RT-PCR reaksiyon tamponu: dNTPs ve MgCl₂ içeren bir tampon.
- 25x RT enzim karışımı: tek-adım RT-PCR enzim karışımı.
- Kontrol (Adeno/Astro/Rota): Pozitif kontrol.

İşleme başlamadan önce aşağıdaki önlemlerine dikkat edilmiştir:

- İzole edilmiş pozitif maddeler (numuneler, kontrol ve diğer ampikonlar) başka ayraçlardan uzak tutulup, reaksiyon karışıma ayrı bir bölgede eklenmiştir.
- Test başlamadan önce kit bileşenleri buz üzerinde erimeye kadar bırakılmıştır.
- Eridikten sonra bileşenler karıştırılıp, kısa santrifüjleme uygulanmıştır.
- Ağız vasıtasıyla pipetleme yapılmamıştır.
- Pipetleme sırasında 2x RT-PCR reaksiyon tamponu, 25x RT enzim karışımı ve primer/prob karışımının PCR ürünleri veya kontrolu bulaşmamasına dikkat edilmiştir. Bunun için filtreli pipet ucu kullanılmıştır.
- Testin duyarlılığı düşüren ve RNA'nın bozulmasına neden olan tekrarlayan numunelerin dondurup çözülmesinden kaçınılmıştır.

RNAse ile konatminasyon riskini önlenmek için bütün test aşamaları poli-eldiven giyilerek uygulanmıştır. Analiz edilecek numuneleri -30 °C'den çıkartılıp, erimeye kadar oda sıcaklığında bırakılmıştır. PCR reaksiyon karışımı kitin kullanım kılavuzuna göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 PCR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
Primer/Probe Miks	4,2 µL
2x RT-PCR Reaksiyon Buffer	10 µL
25x RT Enzim Miks	0,8 µL
Template RNA	5 µL
Nükleaz içermeyen su	5 µL
Toplam	20 µL

Her bir PCR devresinde mevcut olan kuyucuk sayısına göre gerekli olan PCR reaksiyon karışımının miktarı hazırlanmıştır. Şekil 3.10'da PCR karışımının hazırlanması gösterilmiştir.



Şekil 3.10 PCR karışımın hazırlanması

Her bir kuyucuk PCR reaksiyon karışımından 15 μ L ile, numuneden ise 5 μ L ile (toplam 20 μ L) doldurulmuştur. Pozitif kontrol (C+) için numune yerine kontrolden 5 μ L kullanılıp, negatif kontrol (NTC) için ise 5 μ L nükleaz içermeyen su kullanılmıştır. Şekil 3.11'de PCR kuyucuk doldurulması görülmektedir.



Şekil 3.11 PCR kuyucuk doldurulması

Hazırlanan kuyucukların duvarlarının üzerinde oluşan küçük damlacıkları aşağıya getirmek için kuyucuklara kısa santrifüjleme (Short-run) uygulanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Kuyucukların kısa santrifüjlemesi

Hazır olan kuyucuklar kapatılarak Real-time PCR cihazına koyulmuştur (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Real-time PCR

Kullanılacak cihazın kanalları ve sıcaklık profili kitin kullanım kılavuzuna göre ayarlanmıştır. Üç incelenen virus ve bir Internal Control (IC) için dört tane fluorophore kanal kullanılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Kullanılan PCR fluorophore kanalları

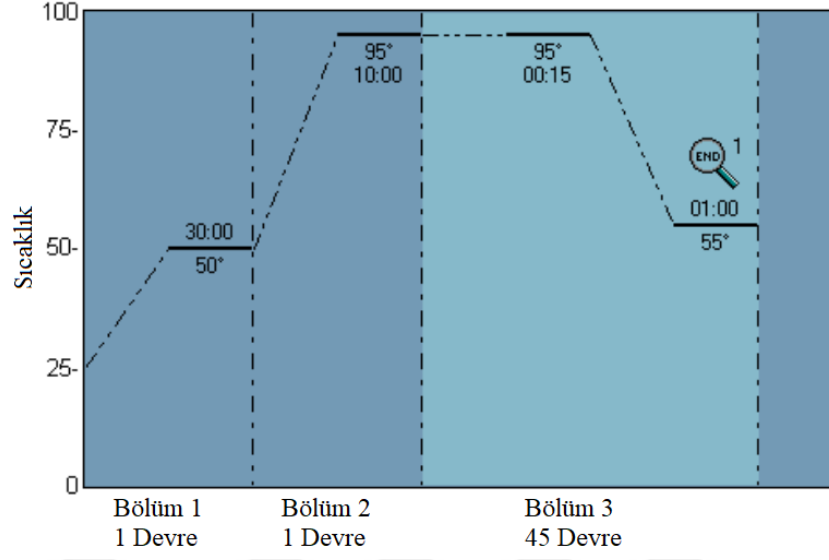
Analit	Fluorophore kanalı
Adenovirus	FAM
Astrovirus	VIC (HEX)
Rotavirus	ROX
IC	Cy5

Çizelge 3.6 ve şekil 3.14'te kullanılan PCR sıcaklık profili gösterilmiştir. Floresans son aşamada saptanmıştır.

Çizelge 3.6 PCR sıcaklık profili

Sıcaklık	Süre	Devre
50 °C	30 dakika	1
95 °C	10 dakika	1
95 °C	15 saniye	45
55 °C	1 dakika	

Sıcaklık profili
(Tahmini süre: 02:16:36)

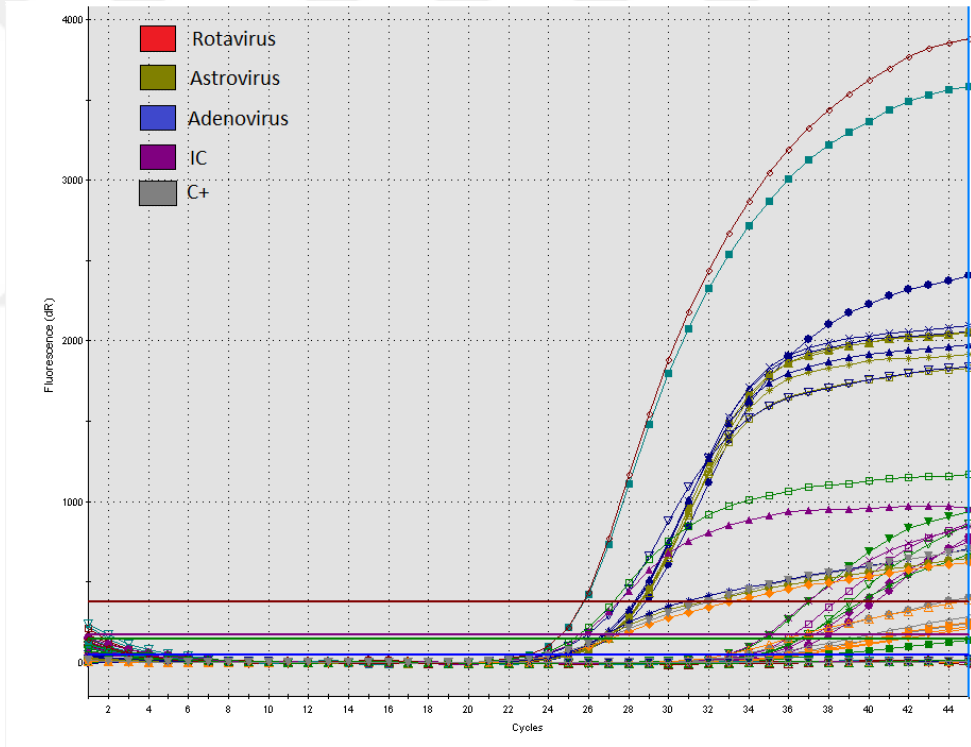


Şekil 3.14 PCR sıcaklık profili

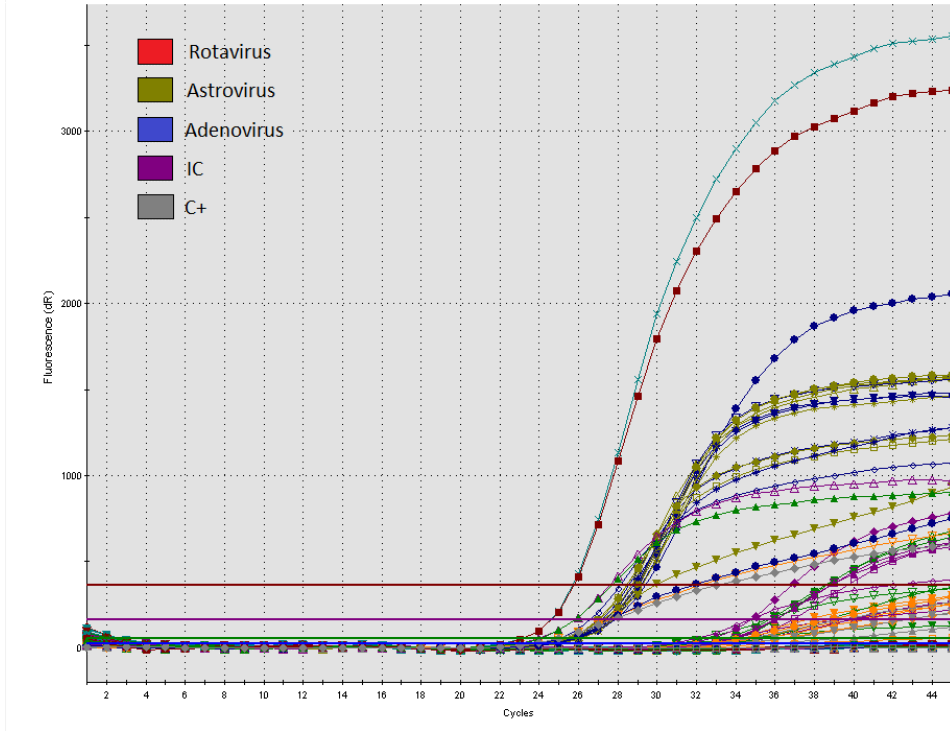


4. BULGULAR

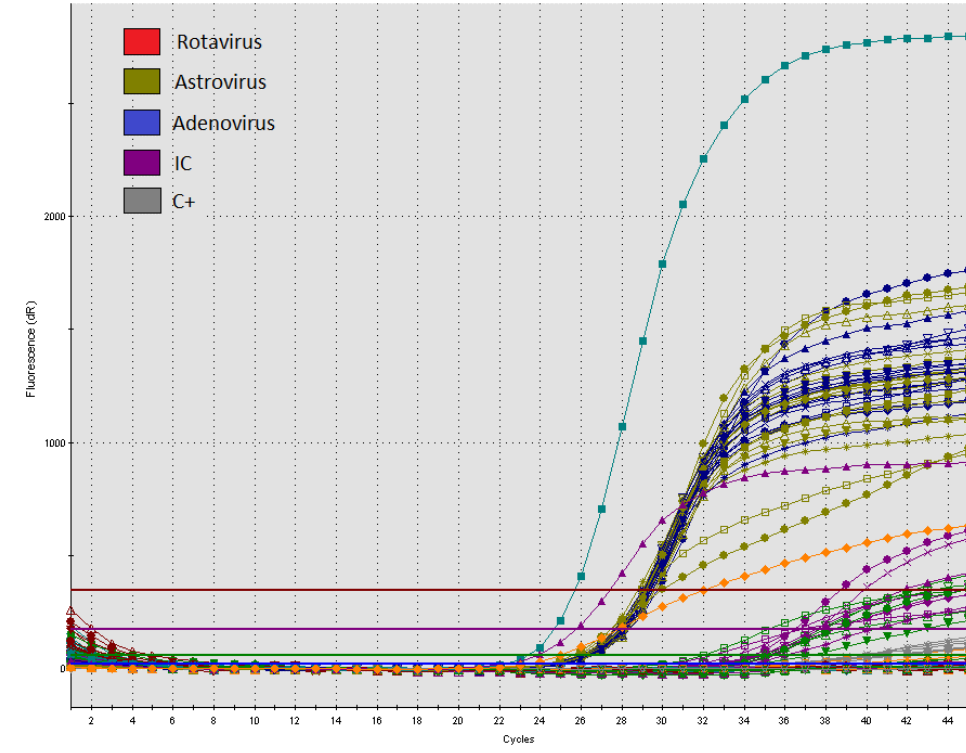
Tüm numuneler Real-time PCR ile incelenmiştir. Her analizden önce her bir numune için nükleik asit konsantrasyonu ölçülmüştür (Spectrophotometer for Life Science, Shimadzu Corporation Analytical & Measuring Instruments Division, Japonya). PCR inhibisyonunu önlemek ve hatasız sonuçları elde etmek için 40 ng/ μ L'den daha yüksek konsantrasyona sahip olan numunelere seyreltme uygulanmıştır. Her analizde internal control (IC) kullanılmıştır. Şekiller 4.1; 4.2; 4.3; 4.4; 4.5'te PCR analizlerin amplifikasyon plotları görülmektedir.



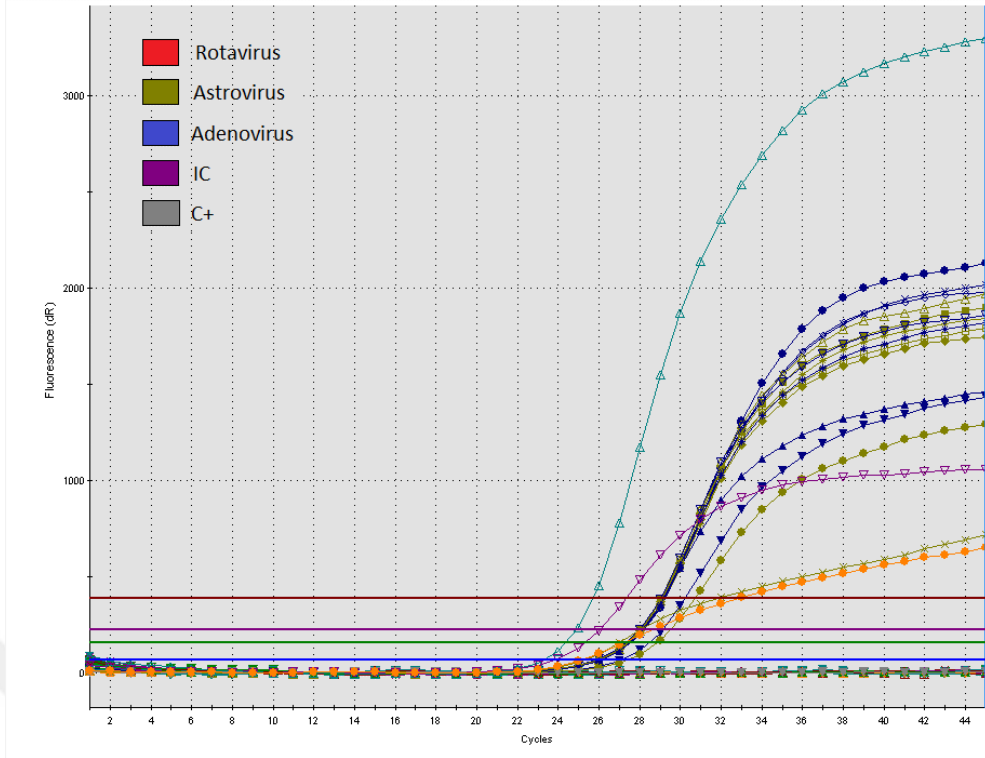
Şekil 4.1 PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 1



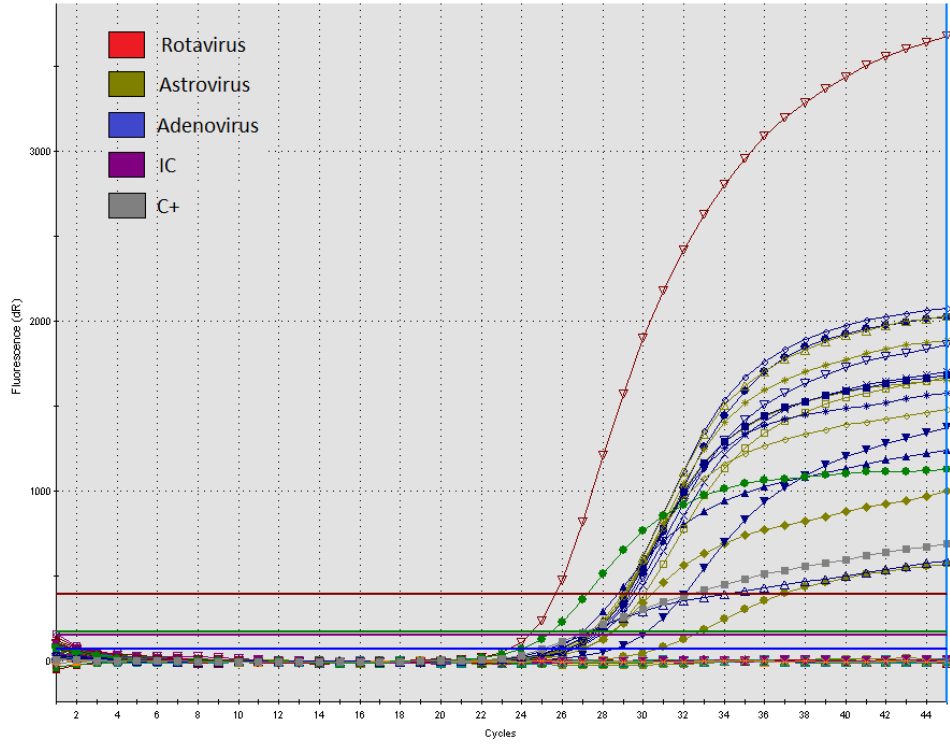
Şekil 4.2 PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 2



Şekil 4.3 PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 3



Şekil 4.4 PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 4



Şekil 4.5 PCR Amplifikasyon Plotları – Analiz 5

Nisan (2017) ayında farklı tarihlerde, Beylikdüzü'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden balıkçı teknelerinden alınan 20 parti midye numunesi analiz edilmiş ve %85'inde (17 partide) adenovirus, %95'inde (19 partide) astrovirus ve %80'inde (16 partide) hem adenovirus hem de astrovirus bulunmuştur. Rumeli Kavağı'ndan balık satış dükkanlarından alınan 13 parti midye numunesinin %38,46'sında (5 partide) adenovirus, %92'sinde (12 partide) astrovirus ve %30,77'sinde (4 partide) hem adenovirus hem de astrovirus saptanmıştır. Beyoğlu İlçesi'nden lokantalardan alınan 19 parti midye numunesini analiz edilmiş ve %10,5'inde (2 partide) adenovirus ve astrovirus için pozitif sonuçları elde edilirken, %5,26'sı (1 partide) hem adenovirus hem de astrovirus için pozitif çıkmıştır. Toplam analiz edilen 52 parti midye numunesinin %46,15'i (24 partide) adenovirus, %63,46'sı (33 partide) astrovirus ve %40,38'i (21 partide) hem adenovirus hem de astrovirus saptanmıştır. Midye numunelerinin hiçbirinde rotavirus bulunmamıştır. Araştırılan enterik virusların hiçbirisi karides numunelerinde tespit edilmemiştir. Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te alınan midye numunelerinin analiz sonuçları, Çizelge 4.4'te numune alma yerine göre midye numunelerinin adenovirus, astrovirus ve rotavirus dağılım oranını, Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de incelenen enterik virusların dağılımı gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden alınan midye numunelerinin analiz sonuçları

Parti No Midye Numuneleri	Rotavirus	Adenovirus	Astrovirus
1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	+
6	-	+	+
7	-	+	+
8	-	+	+
9	-	-	+
10	-	+	+
11	-	-	+
12	-	+	+
13	-	+	+
14	-	-	+
15	-	+	+
16	-	+	+
17	-	+	+

Çizelge 4.1 (devam) Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden alınan midye numunelerinin analiz sonuçları

18	-	+	+
19	-	+	-
20	-	+	+

Çizelge 4.2 Rumeli Kavağı'ndan alınan midye numunelerinin analiz sonuçları

Parti No Midye Numuneleri	Rotavirus	Adenovirus	Astrovirus
21	-	-	+
22	-	-	+
23	-	-	+
24	-	+	+
25	-	-	+
26	-	+	+
27	-	-	+
28	-	+	-
29	-	+	+
30	-	+	+
31	-	-	+
32	-	-	+
33	-	-	+

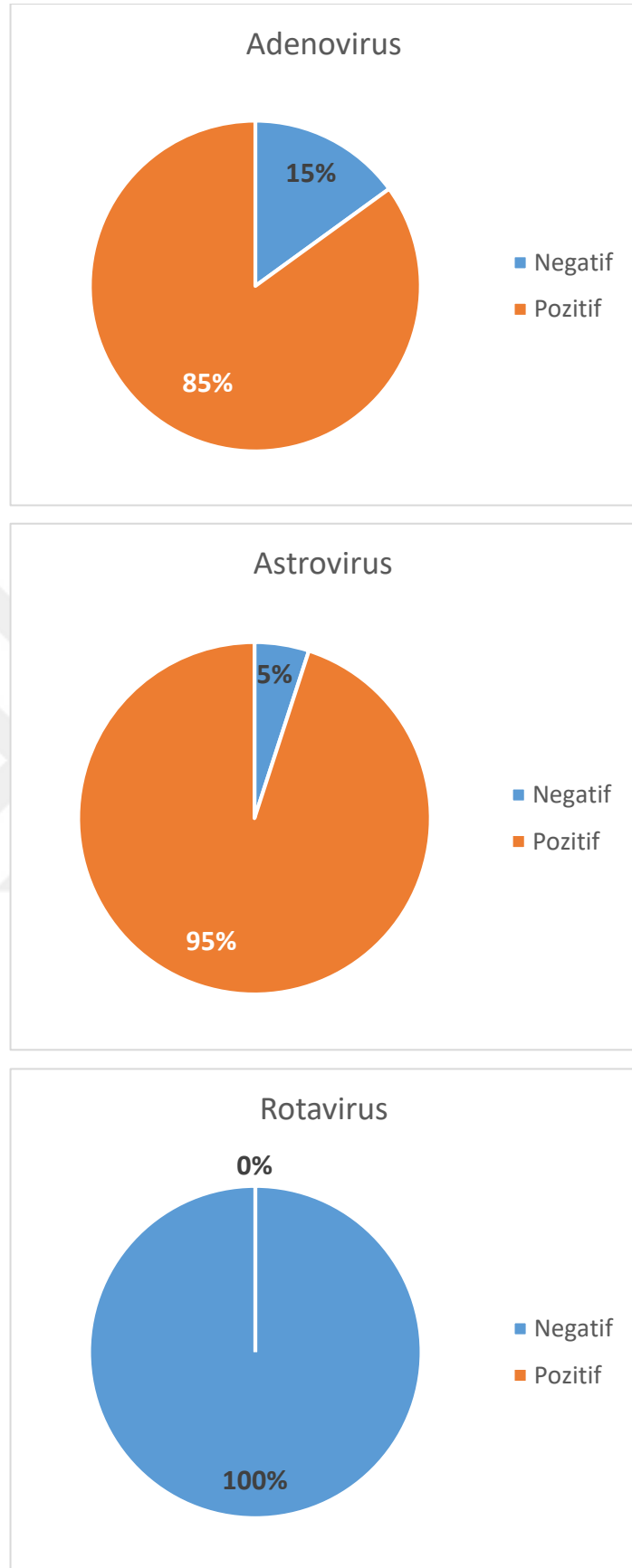
Çizelge 4.3 Beyoğlu'ndan alınan midye numunelerinin analiz sonuçları

Parti No Midye Numuneleri	Rotavirus	Adenovirus	Astrovirus
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	+	+
37	-	-	+
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	+	-
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
51	-	-	-
52	-	-	-

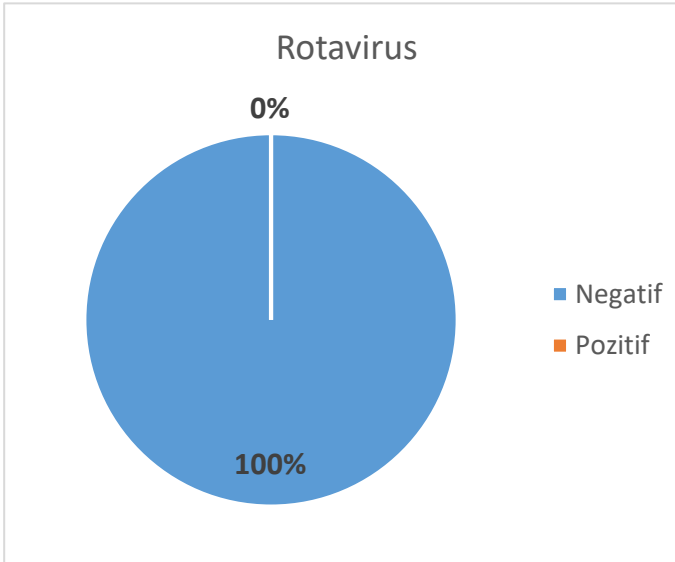
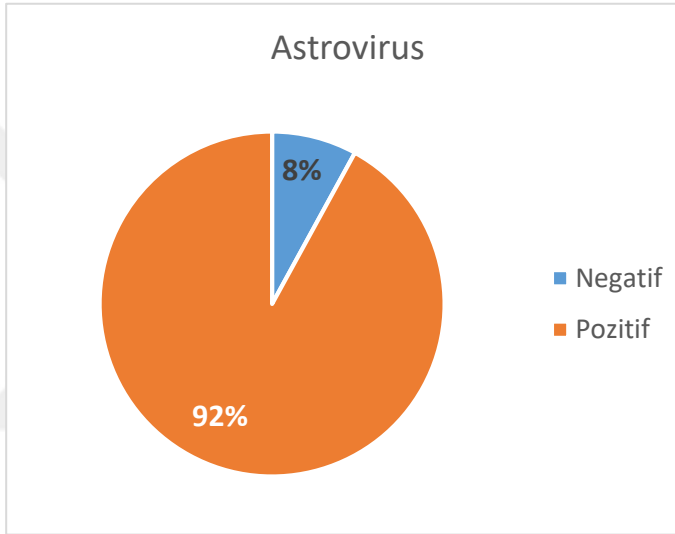
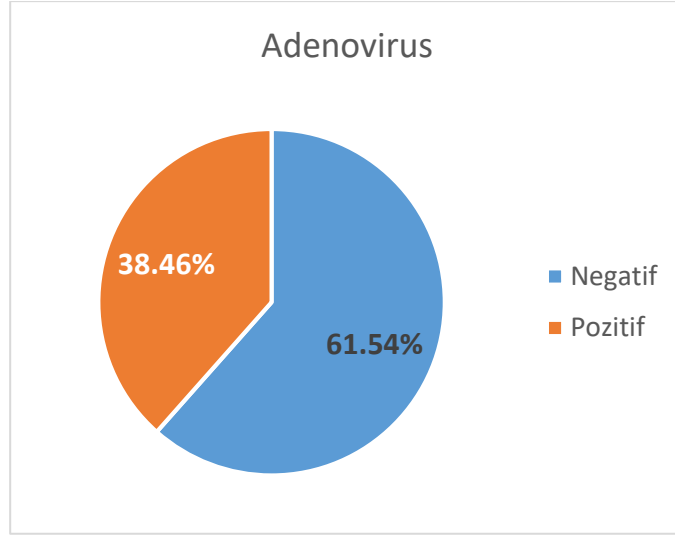
Çizelge 4.4 Numune alınan yere göre midye numunelerinin adenovirus (AdV) astrovirus (AsV) ve rotavirusun (RV) dağılım oranı

Midye numuneleri		AdV pozitif		AsV pozitif		RV pozitif		AdV ve AsV pozitif	
Alınan yer	Parti sayısı	N*	%	N	%	N	%	N	%
Gürpınar Su Ürünleri Hali	20	17	%85	19	%95	0	%0	16	%80
Rumeli Kavağı	13	5	%38,46	12	%92	0	%0	4	%30,77
Beyoğlu	19	2	%10,5	2	%10,5	0	%0	1	%5,26
Toplam	52	24	%46,15	33	%63,46	0	%0	21	%40,38

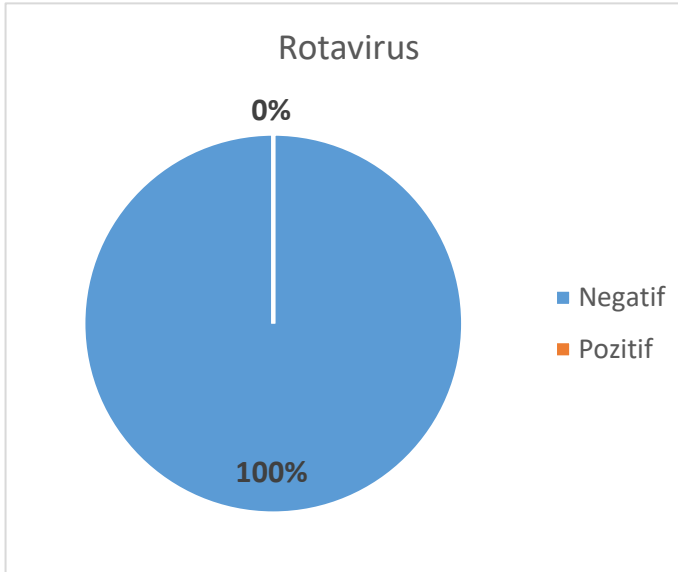
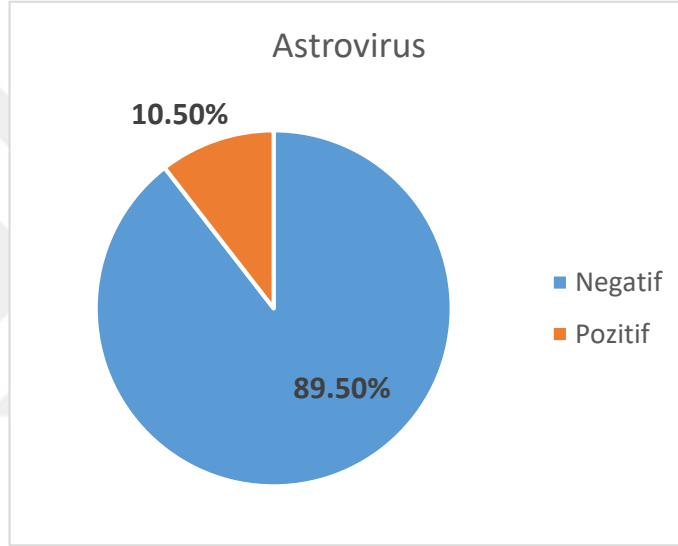
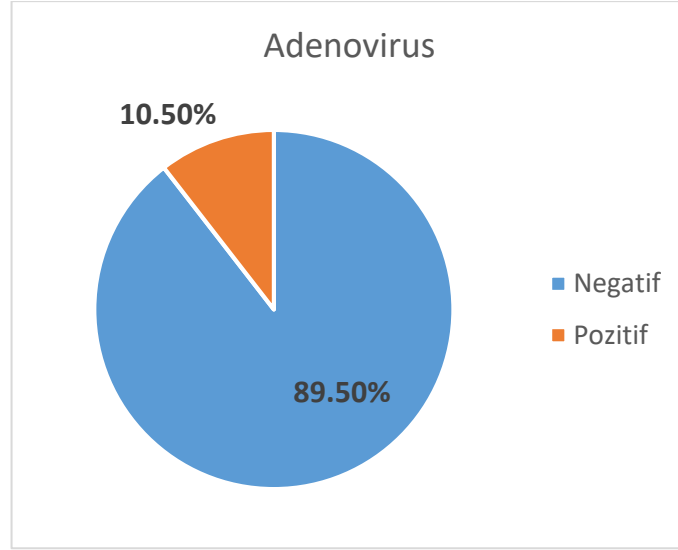
*N: Pozitif numunenin sayısı



Şekil 4.6 Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden Nisan-2017'de alınan midye numunelerinde adenovirus, astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı

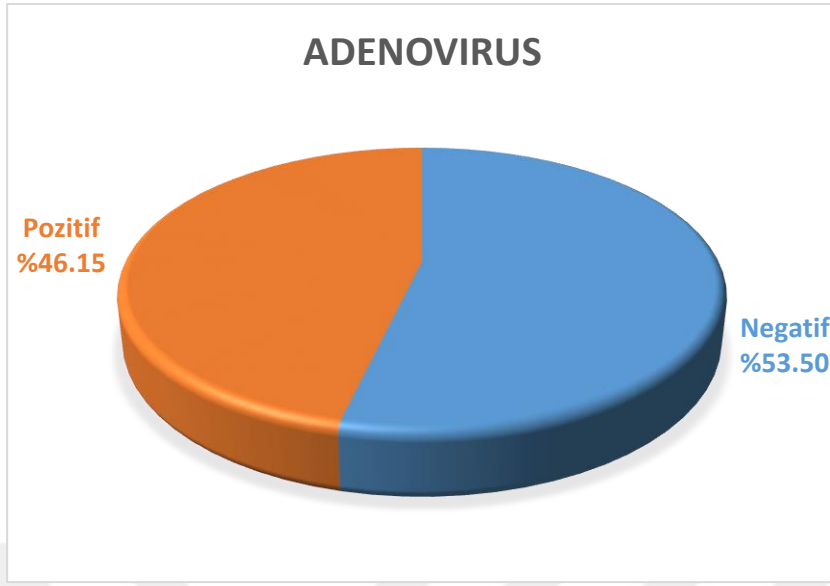


Şekil 4.7 Rumeli Kavağı'ndan Nisan-2017'de alınan midye numunelerinde adenovirus, astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı



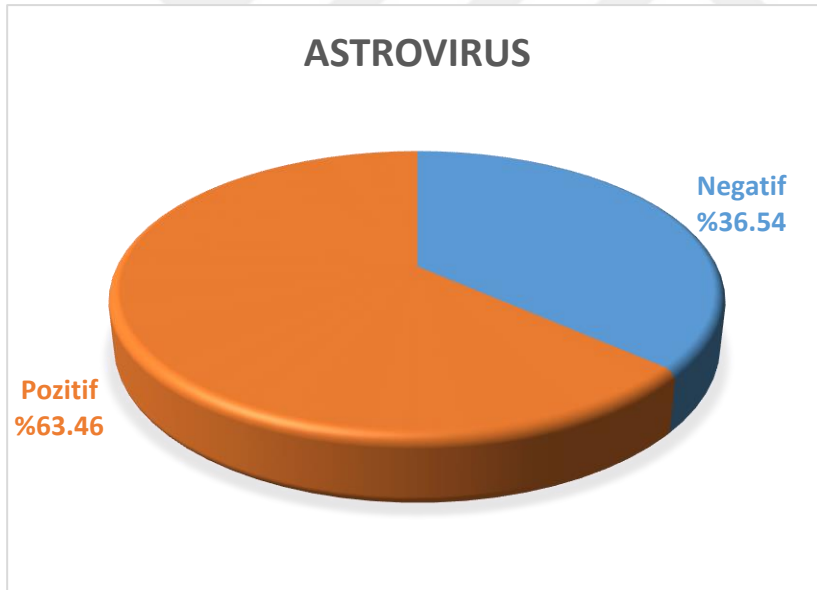
Şekil 4.8 Beyoğlu'ndan Nisan-2017'de alınan midye numunelerinde adenovirus, astrovirus ve rotavirusun dağılım oranı

Şekil 4.9’da tüm midye numunelerinde adenovirus oranı görülmektedir.



Şekil 4.9 Tüm midye numunelerinde adenovirus oranı

Şekil 4.10’da tüm midye numunelerinde astrovirus oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Tüm midye numunelerinde astrovirus oranı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda viruslar gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde önemli etkenler olarak tanımlanmaktadır. Çok az virus çeşidi gıda kaynaklı ve gıdalardan kaynaklanan hastalıklara neden olmaktadır. Viruslar gıdalarda çoğalamazlar fakat kontaminasyon, insanlar için en önemli bulaşma kaynağıdır. Üzerinde buldukları gıdaların tüketilmesi sonucu vücuda girerek hastalıklara neden olan viruslardan bazıları; hepatit A virusu (HAV), norwalk ve norwalk benzeri viruslar, polioviruslar, echoviruslar, astroviruslar, caliciviruslar, enterik adenoviruslar, parvoviruslar ve rotaviruslardır. Enterik viruslar intestinal sistemde çoğalabilmekte ve dışkı ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu vücuda girerek hastalığa neden olabilmektedir.

Viruslar çevre şartlarında ve gıdalarda çoğalamadıkları için gıdaların işlenmesi, paketlenmesi ve taşınması sırasında bulaşma olmaktadır. Bu yüzden bu aşamaların her birinde hijyenik şartların kurallara uygun ve tam anlamıyla uygulanması çok önemlidir.

Virusla kontamine olmuş sularda yetişen kabuklu deniz hayvanları gastroenterit ve hepatit hastalıklarının iyi belgelenmiş kaynağı olarak tanınmaktadır (Dienstag ve diğ., 1976; Richards, 1987). İnsan dışkısında norovirus, enterovirus, adenovirus, hepatit A virusu (HAV), hepatit E virusu (HEV), rotavirus ve astrovirus gibi birçok enterik viral patojen türü bulunmaktadır. Bu virusların çoğu gıda kaynaklı hastalık salgınları ile ilişkili görülmektedir (Greening, 2006).

Kabuklularda farklı enterik virusların yayılması bütün dünyada birçok çalışmada ve sayıca çok kişi tarafından araştırılmıştır. Kabuklu deniz hayvanlarında rotavirus varlığını saptamak için Hindistan'da 2014 yılında bir çalışma yapılmıştır. Toplam 200 midye ve deniz tarağı numunesi güney Hindistan'daki Kerala'nın iki farklı yerinden Ekim 2010 ve Şubat 2012 tarihlerinde toplanıp, RT-PCR ile analiz edilmiştir. Alınan kabuklu deniz hayvanların sindirim dokusu çıkarılmış ve proteinaz K kullanılarak işlenmiştir. Toplam 200 midye ve deniz tarağı numunesinden 5 numunenin (%2,5) rotavirus pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Rotavirus 60 kahverengi midye numunesinden 2 numunede (%3,33), 70 sarı deniz tarağı numunesinden 2 numunede

(%2,86) ve 70 siyah deniz tarağı numunesinden bir numunede bulunmuştur (Mohan ve diğ., 2014).

Güney İtalya'da Akdeniz midyesinde (*Mytilus galloprovincialis*) farklı gıda kaynaklı virusların prevalansı araştırılmıştır. İki yıl boyunca, 108 midye numunesi (2014 yılında 25 midye grubu, 2015'te ise 83 midye grubu) toplanmış ve Real-time reverse transkripsiyon PCR kullanılarak incelenmiştir. Her bir numune için ortalama on adet midyeden sindirim dokusu (hepatopankreas) çıkarılarak birleştirilmiş ve analiz edilmiştir. Aranan viruslar human norovirusu (genogrup I ve II), rotavirus, astrovirus, sapovirus, aichivirus, hepatit A virusu ve hepatit E virusu kapsamaktadır. Toplam numunelerin %50,93'ünün aranan viruslardan en az birisi ile kontamine olduğu ortaya koyulmuştur. Analiz edilen ilk 25 midye numunesinin (2014 yılında toplanan) sapovirus (%16,00), astrovirus (%16,00) ve aichivirus (%8) pozitif olduğu saptanmıştır. İkinci yıl (2015) toplanan 83 numunenin astrovirus (%32,53), norovirus GII (%26,50), sapovirus (%18,07), hepatit A virusu (%16,87), rotavirus (%16,87), aichivirus (%13,25) ve norovirus GI (%12,05) pozitif olduğu saptanmıştır (Fusco ve diğ., 2017).

Diğer bir araştırmada 2013 yılında, Çin'de on şehirden toplam 162 kabuklu deniz hayvanı numunesi (127 deniz tarağı (*Macra chinensis*, *Macra Veneriformis*, *Dosinia Japonica*, *Dosinia biscocta*, *Paphia undulata*, *Paphia euglypta*, *Ruditapes philippinarum*, *Sinonovacula constrictai*, *Solen grandis*, *Scapharca subcrenata*, *Scapharca labiosa*, *Tegillarca granosa*, *Pecten farreri*, *Pecten yessoensis*), 18 midye (*Mytilus edulis*, *Perna viridis*) ve 17 istiridye (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea plicatula*) olmak üzere) toplanıp, farklı enterik virusların varlığını saptamak için analiz edilmiştir. Aranan enterik viruslar hepatit A virusu (HAV), norovirus (NV), rotavirus (RV), poliovirus (PV), astrovirus (AsV) ve adenovirusu (AdV) kapsamaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarında aranan enterik virusların varlığı RT-PCR metodu kullanılarak belirlenmiştir. İncelenen her bir numune için kabuklu deniz hayvanlarından 500 gram alınmış ve virus elüsyonu için glisin tamponu kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda PV %15 (25/162 oranında) bulunmuş ve en çok rastlanan virus türü olduğu ortaya çıkarılmıştır. Takip eden NV numunelerinin %12'sinde (20/162 numunede), AdV %9 (15/162 numunede), RV %7 (10/162 numunede), AsV %6 (9/162 numunede) ve HAV %5 (8/162 numunede) oranında saptanmıştır. Bu çalışmada incelenen toplam 18 midye numunesinin hiçbirinde rotavirus ve adenovirus

bulunmamış, ancak 1 adet midyede AsV, birer adet midyede HAV ve NV tespit edilmiştir (Xia Ming ve diğ., 2013).

Güneybatı Hindistan kıyılarının dışkı ile kontaminasyon derecesini değerlendirmeyi hedefleyen bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada 100 numune istiridye (*Crossostrea madrasensis*), 74 numune deniz tarağı (*Meritrix meritrix*) ve 20 numune karides (*Penaeus monodon*), toplam 194 numune olmak üzere enterovirus, adenovirus, norovirus ve hepatit A virusu saptamak için analiz edilmiştir. Her bir numune için 20 istiridye, 30 deniz tarağı ve 10 karides'in sindirim dokuları çıkarılarak tek bir numune olacak şekilde birleştirilmiş ve RT-PCR ile analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda istiridye numunelerinin %17'sinin adenovirus ve %37'sinin enterovirus ile bulaşmış olduğu saptanmıştır. 74 deniz tarağı numunesinde adenovirus %27 (20 tane) ve enterovirus %46 (34 tane) oranıyla bulunmuştur. Bütün istiridye ve deniz tarağı numuneleri hepatit A virusu ve norovirus için negatif çıkmıştır. İncelenen karides numunelerinin 3 tanesi (%15) enterovirus için pozitifken, tüm aranan diğer virusları için negatif sonuç vermiştir (Umesha ve diğ., 2008).

Kuzey Tunus'ta Temmuz 2000 – Eylül 2001 arasında, numune toplamak için iki yer belirlenmiş ve her belirlenen yerden tekrar iki toplama noktasından toplanan, toplam 23 numunede (altı adet midye ve 17 deniz tarağı) astrovirus (AsV), enterovirus (EV), norovirus (NV) ve hepatit A virusu (HAV) varlığını tespit etmeyi hedefleyen bir çalışma yapılmıştır. Her analiz için kabukluların sindirim dokuları çıkarılıp, analizde 1.5 gramlık homojenize edilmiş sindirim dokusu kullanılmıştır. Ayrıca, aranan viruslar PEG-6000 kullanılarak konsantre edilmiştir. Toplam 23 numunenin %83'ünü en az bir virus türü için pozitif olduğunu ortaya koyulmuştur. Astrovirus numunelerinin %61'inde, norovirus numunelerinin %35'inde ve hepatit A virusu numunelerin %26'ında saptanmıştır. İncelenen 6 midye numunesinin bir adedinde sadece astrovirus, bir adedinde sadece norovirus, bir adedinde EV ve NV, bir adedinde de hem HAV hem de NV bulunmuştur (Elamri ve diğ., 2006).

Başka bir olayda, güney Fransa'dan toplanan istiridye ve midye numunelerinde hepatit A virusu (HAV), norovirus, enterovirus, rotavirus ve astrovirus varlığı belirlenmiştir. Her numune en az 20 istiridye veya 30 midye içermiştir. Her bir midye ve istiridye numunesi için mide ve sindirim dokusundan 1,5 gramlık 3 parça çıkarılarak analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır. Toplanan kabuklu deniz hayvanları RT-PCR ile analiz edilmiştir. İstiridye numunelerinin midye numunelerinden daha az kirletilmiş

olduğu saptanmıştır. İstiridye numunelerinin (toplam 108 numune) astrovirus %17, norovirus %23, enterovirus %19 ve rotavirus %27 pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Mide numunelerinde ise (toplam 73 numune) astrovirus %50, HAV %13, norovirus %35, enterovirus %45 ve rotavirus %52 oranında tespit edilmiştir (Le Guyader ve diğ., 2000).

Diğer bir araştırmada Norveç kıyısından 86 mavi midye (*Mytilus edulis*), at midyesi (*Modiolus modiolus*) ve istiridye (*Ostrea edulis*) numunesi toplanmış ve adenovirus varlığı numunelerinin %18,6 oranında saptanmıştır. Her bir numune 10-25 midye veya 5 istiridye içermiştir. Bu çalışmada virus ayrıştırılması için glisin tamponu kullanılmıştır. Pozitif numunelerin sayısı kış mevsiminde artmaktadır (Myrmel ve diğ., 2004).

Ayrıca, Muniain-Mujika ve diğerleri 2003 yılında İspanya kıyısından toplanan Akdeniz siyah midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) ve istiridyelerde (*Crassostrea gigas*) insana ait patojenik virusların varlığını araştırmışlar ve aranan virusların ayrıştırılması için glisin tamponu kullanmışlardır. Adenovirusun numunelerin %47'sinde, enterovirusun numunelerin %19'unda ve hepatit A virusunun numunelerin %24'ünde bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Kabuklularda enterik virusun yayılmasını analiz etmek için eş zamanlı bir şekilde Avrupa'nın birçok coğrafi bölgesinde geniş kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Çalışma kapsamında 475 (*Mytilus edulis*) mavi midye numunesi dört farklı ülkeden toplanmış (Yunanistan - 144 numune; İspanya – 104 numune; İsveç – 54 numune ve İngiltere – 173 numune) ve human adenovirusu, norovirus, enterovirus ve hepatit A virusu varlığını saptamak için incelenmiştir. Numuneler özel midye yetiştirme bölgelerinden alınmıştır. Yunanistan'dan alınan 144 numunede adenovirus %33, enterovirus %15, hepatit A virusu %4 ve norovirus GII %2 oranında saptanmıştır. İspanya'dan toplanan midye numunelerinin %36'sında adenovirus, %26'sında enterovirus, %3'ünde hepatit A virusu, %12'sinde norovirus GI ve %14'ünde norovirus GII tespit edilmiştir. İsveç'ten alınan midyelerde ise adenovirus %33, enterovirus %24, norovirus GI %17 ve norovirus GII %24 oranında bulunmuştur. İngiltere'den toplanan midye numunelerinin %46'sında adenovirus, %14'ünde enterovirus, %1'inde hepatit A virusu, %5'inde norovirus GI ve %5'inde norovirus GII saptanmıştır. Bu çalışmada her bir numune için 20 istiridye ve 20-30 midyenin sindirim dokusunu çıkarılarak birleştirilmiş ve analiz edilmiştir. Her bir numunede 30 gram sindirim dokusu

kullanılmıştır. Bu çalışmada aranan viruslar sindirim dokusundan ayrıştırılmak için glisin tamponu kullanılmıştır (Formiga-Cruz ve diğ., 2002).

Türkiye'de kabuklularda enterik virusların yayılması hakkında birkaç çalışma bulunmaktadır. İzmir Körfezi'nden toplanan 795 adet midyenin, *Microsporidia spp.*, hepatit A virusu (HAV) ve norovirus (NV) kontaminasyon oranı araştırılmıştır. Çalışmada incelenen midyelerin HAV (%26,7) ve NV (%30) ile kontamine oldukları ortaya koyulmuştur (Erol ve diğ., 2016). İstanbul'un Boğaz çevresinden toplanan 110 midye numunesinde human norovirusu (NV) genogrup I ve II sıklığının belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, toplanan midyelerde NV genogrup II'un %4,5 oranında bulunduğu tespit edilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2010). Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesi'ndeki Samsun İli'nden toplanan 600 midye, 60 numuneye bölünerek hepatit A virusu (HAV) varlığı 2010 yılında araştırılmıştır. Her midye numunesi 10 adet midye içermiştir. Sonuçta kontrol edilen numunelerinin iki adedinde HAV pozitif olduğu ortaya koyulmuştur (Terzi ve diğ., 2010).

İstanbul kıyılarında midye ve karides satışının yoğun olarak yapıldığı Beylikdüzü İlçesi'nden Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden balıkçı teknelerinden, Rumeli Kavağı'ndan balık satış dükkanlarından ve Beyoğlu'nda lokantalardan alınan canlı ve işlenmemiş midye numunelerinin araştırıldığı bu çalışmada Real-time PCR yöntemi ile çalışılmış ve midyelerde değişik oranlarda adenovirus ve astrovirus varlığı saptanmıştır. Hiçbir midye numunesinde rotavirus tespit edilmemiştir. Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden balıkçı teknelerinden toplanan 500 adet midye numunesi 20 partiye bölünerek analiz edilmiş ve parti midye numunelerinin %85'i adenovirus pozitif, %95'i astrovirus pozitif iken, %80'i hem adenovirus hem astrovirus pozitif bulunmuştur. Rumeli Kavağı'ndan balıkçı dükkanlarından alınan 350 adet midye numunesi 13 partiye bölünerek test edilmiş ve bu şekilde incelenen midyelerin %38,46'sı adenovirus, %92'si astrovirus pozitif, %30,77'si de hem adenovirus hem de astrovirus pozitif olarak tespit edilmiştir. Beyoğlu'ndan lokantalardan alınan 500 adet midye numunesi 19 partiye bölünmüş ve analiz edilmiştir. Bunların %10,5'i adenovirus, %10,5'i astrovirus, %5,26'sı da hem adenovirus hem de astrovirus pozitif bulunmuştur. Toplam analiz edilen 52 parti midye numunesinin %46,15'i (24 partide) adenovirus, %63,46'sı (33 partide) astrovirus ve %40,38'i (21 partide) hem adenovirus hem de astrovirus saptanmıştır.

Özellikle astrovirusun durumunu incelendiğimizde, oldukça yüksek oranlarında bulunmuştur. Bu çalışmada astrovirus Beylikdüzü'nde Gürpınar Su Ürünleri Hali'nden toplanan numunelerde %95'iken, Rumeli Kavağı'nda %92 oranında saptanmıştır.

Gıda kaynaklı virusların asit, ısı, kurutma, basınç, dezenfektanlar ve ultraviyole radyasyonu gibi farklı çevresel zorluklara değişen dayanıklılık göstermesine rağmen, genellikle sağlam tabiatlıdır ve çevrede iyi bir şekilde canlı kalabilmektedirler (FAO/WHO, 2008). Astrovirusun içme suyu (Abad ve diğ., 1997b), tatlı ve deniz suyunda sağlamlığı ve kolay yayılmasını ve bu virusun çevresel şartlara dirençliğini elde edilen yüksek oranlarını açıklayabilmektedir (Bosch ve diğ., 2014).

Le Guyader ve diğerleri (2000) tarafından yapılan çalışmada astrovirusun varlığı analiz edilen midye numunelerinin %50'sinde saptanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasının sonuçlarına göre astrovirusun varlığı %63,46 oranıyla Le Guyader'den yüksekken, Elamri ve diğ. (2006) toplam midye ve deniz tarağı çalışması sonuçlarına (%61) oldukça yakın bir oranda saptanmıştır. Elamri ve diğ. (2006), sadece 6 midye numunesi ile çalışmışlar ve bir adedinde astrovirus (%16,67) tespit etmişlerdir. Çalışılan midye numunelerinin az sayıda olması sonuçları karşılaştırmada sorun oluşturmaktadır. Fusco ve diğ. (2017) her bir numune için ortalama on adet midyeden sindirim dokusu (hepatopankreas) çıkararak birleştirip analiz ettikleri çalışmada; ilk aldıkları 25 midye numunesinin (2014 yılında toplanan) astrovirus yönünden %16,00 pozitif; ikinci yıl (2015) toplanan 83 numunenin %32,53 astrovirus pozitif olduğunu saptamışlardır. Türkiye'de kabuklu deniz hayvanlarında astrovirus varlığı ile ilgili yapılmış bilimsel araştırma yoktur.

Daha önce yapılan çalışmalarda; adenovirus oranı Norveç kıyılarında 86 midye örneğinde %18,6 ile bu tezin sonuçlarına göre oldukça düşük bulunurken (Myrmel ve diğ., 2004); her bir numunede 30 gram sindirim dokusunun analiz edildiği başka bir çalışmada Yunanistan'da 144 numunede %33, İsveç'te 54 numunede %33 ve İspanya'da 104 numunede %36 gibi, daha düşük oranda olmakla birlikte bu tezin sonuçlarına (%46,15) yakın değerler saptanmıştır. Aynı çalışmada İngiltere'de 173 numunede ise tamamen aynı oranda (%46) adenovirus saptanmıştır (Formiga-Cruz ve diğ., 2002). Türkiye'de kabuklularda adenovirus hakkında yapılmış hiçbir çalışma yoktur.

Bu tez çalışmasında midye numunelerinin hiçbirinde rotavirus bulunmamıştır. Hindistan'da 2014 yılında yayınlanan Mohan ve diğerlerinin çalışmasında, RT-PCR yöntemi ile, rotavirus 60 kahverengi midye numunesinden 2 numunede (%3,33) bulunmuştur. Güney Fransa'da, rotavirus varlığının belirlendiği çalışmada RT-PCR yöntemi kullanılarak midye numunelerinde (toplam 73 numune) %52 rotavirus tespit edilmiştir (Le Guyader ve diğ., 2000). Fusco ve diğerlerinin (2017) İtalya'da yapılan çalışmasında midye numunelerinin %16,87'sinde rotavirus saptanmıştır. Hindistan'da yapılan Mohan ve diğerlerinin çalışmasında rotavirus varlığı oldukça düşük oranında (%3,33) tespit edilirken, Fransa'da (%52) ve İtalya'da (%16,87) daha yüksek oranda bulunmuştur. Bununla birlikte, Çin'de yapılan Xia Ming ve diğerlerinin (2013) çalışmasının kapsamında, bu çalışma ile aynı şekilde, incelenen midye numunelerinin hiçbirinde rotavirus saptanmamıştır. Midyelerde rotavirus ile ilgili yapılan tüm çalışmalarda çok farklı oranlarda rotavirus varlığı saptanmıştır. Türkiye'de kabuklu deniz ürünlerinde rotavirus varlığı araştırılan hiçbir bilimsel çalışması bulunmamaktadır.

Karides üzerinde yapılan bir araştırmada, güney Brezilya'da pembe karideste adenovirus biyolojik birikimini belirlenmiştir. Çalışmada 100 pembe karides (*Farfantepenaeus paulensis*) numunesi Haziran 2012 ve Mayıs 2013 tarihleri arasında toplanıp, Real-time qPCR ile analiz edilmiştir. İncelenen numunelerinin %35'nin adenovirusun farklı türleri içerdiği saptanmıştır (AvAdV %17, BAdV %13, CAdV %7 ve PoAdV %2). HAdV hiçbir karides numunesinde saptamamıştır. Numuneler aşırı derecede kirletilmiş ve içinde su arıtma sistemi bulunmayan göl kıyılarından toplanmıştır (Luz ve diğ., 2015).

Karideslerin (*Penaeus schmitti*) enterik hastalıkların iletimindeki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, Venezuela'nın batısındaki topraklardan ve yerel deniz ürünleri satış yerlerinden ve doğrudan Maracaibo Gölü'nden toplam 33 karides örneğinden 16'sında (%49) polioviruslar 1 ve 2 ve echovirus türleri 20, 21, 27 ve 29 olmak üzere altı tür enterovirus izole edilmiştir. Bu çalışma sonuçları, enterovirusların kanalizasyon bulaşan deniz sularında bulunan karides popülasyonlarında mevcut olabileceğini göstermektedir (Botero ve diğ., 1996).

Güneybatı Hindistan kıyılarından toplanan 20 karides numunesi (*Penaeus monodon*), enterovirus, adenovirus, norovirus ve hepatit A virusu saptamak için analiz edilmiştir. Her karides numunesi için 10 adet karides'in sindirim dokuları çıkarılarak tek bir

numune olacak şekilde birleştirilmiş ve RT-PCR ile analiz edilmiştir. İncelenen karides numunelerinde sadece enterovirus (%15) tespit edilirken, hiçbir numunede adenovirus ve araştırılan diğer viruslar saptanmamıştır (Umesha ve diğ., 2008).

Yapılan bu Yüksek Lisans tez çalışmasında, İstanbul'da her üç yerden alınan hiçbir karides numunesinde, Real-time PCR yöntemi ile rotavirus, astrovirus ve adenovirus saptanmamıştır. Brezilya'da pembe karideste adenovirus biyolojik birikimini saptamak üzere yapılan çalışmada numunelerin aşırı derecede kontamine ve içinde su arıtma sistemi bulunmayan göl kıyılarından toplanmış olması nedeniyle daha yüksek oranda saptanmış olması muhtemeldir. Güneybatı Hindistan'da yapılan çalışmada, hiçbir karides numunesinde adenovirus, norovirus ve hepatit A virusu saptanmamış olup bu tezin sonuçları ile uyumaktadır. Türkiye'de karideslerde enterik virusların varlığıyla ilgili çalışma yoktur.

Karideslerde enterik virusların biyoakümülyasyonu ile ilgili yapılmış fazla çalışma yoktur. Ancak karides ve diğer kabuklular, beslenme esnasında enterik virusları ve bakterileri biriktirebilmektedir (DiGirolamo ve diğ., 1972; Umesha ve diğ., 2008). Dahası, kontamine sudaki organizmaların, mekanik vektörleri gibi davranarak yüzeylerinde veya bağırsaklarında virus taşıyabileceği öne sürülmüştür (Stentiford ve diğ., 2009). Hindistan'da karideslerin enterovirus kontaminasyonu (Umesha ve diğ., 2008), Venezuela'da ise poliovirus tip 1 ve 2 kontaminasyonu bildirilmiştir (Botero ve diğ., 1996). İnsanlar veya diğer hayvanlar tarafından nakledilen virusların karides hücrelerinde çoğalması mümkün olmadığı halde az pişmiş kontamine karideslerin tüketilmesi ciddi bir sağlık riski oluşturabilmektedir.

Karides, midyeden farklı olarak, denizdeki derin yerlerden avlanmaktadır. Midyeler çoğunlukla kayalık deniz kıyısına yakın yerlerde yaşar ve oradan toplanmaktadır. Ayrıca, midyeler filtrasyonla beslenirken ağır metal, bakteri ve virusları kapsayan gıda parçacıkları yığarak her saat 4 – 20 litre su filtre etmektedir. Filtrasyonla beslenme sırasında mikroorganizmalar sindirim bezine girer ve içinde yoğunlaşmaktadır. Çevreleyen sular yüksek virus miktarı içerdiği durumda, midyeler birkaç saat içinde yüksek virus konsantrasyonu yığabilmektedir (Greening, 2006). Bu nedenle midyelerin karideslerden daha yüksek virus partikülü içermesi muhtemeldir. Enterik virusların başlıca bulaşma kaynağı olan atık su deniz kıyısına yakın olarak bırakılmaktadır. Dolayısıyla, deniz kıyısına yakın olan yerlerden toplanan midyeler karidesten daha kirletilmiş olduğu umulmaktadır.

İnsanlarda enterik virus enfeksiyonlarının insidansı hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Kore'de akut gastroenteritten muzdarip olan hastalarda human astrovirusu varlığı RT-PCR ve elektroforez yöntemi ile araştırılmıştır. Seul'de yerli hastanelerde bulunan 9597 ishali hastadan dışkı örnekleri toplanmıştır. Astrovirus %1 oranıyla (94 numunede) saptanırken, sapovirus %0,1 oranıyla (14 numunede) tespit edilmiştir. Yirmidokuz astrovirus pozitif hasta üzerinde yaş ve cinsiyete dayalı analizleri yapıldıktan sonra, astrovirusun 0 ve 14 yaş arasında hastalarda daha yaygın olduğu, astrovirus pozitif hastaların %69'u bayan olduğu, onlardan %69,2'si bebek olduğu ve astrovirus pozitif hastaların %61,5'i 1-4 yaş arasında olduğu ortaya koyulmuştur (Ham ve diğ., 2014).

Türkiye'nin doğu Anadolu Bölgesi'nde gastroenterit hastalığından muzdarip olan çocuklarda rotavirus ve adenovirus varlığı incelenmiştir. Çalışmada toplam alınan 1154 dışkı numunesi, rotavirus ve adenovirus antijenlerini saptamak için immüno-kromatografik metotla incelenmiştir. Viral antijenler toplam 327 (%28,3) dışkı numunesinde bulunmuştur. Rotavirus pozitif numunelerin %73,7'sinde saptanırken, adenovirus pozitif numunelerin %26,2'sinde tespit edilmiştir. Rotavirus antijeni bütün yaş gruplarında yüksekken, iki yaş ve altı çocuklarında en yüksek oranında (%57,1) gözlenmiştir. Ayrıca, rotavirus enfeksiyonları kış mevsiminde %44,3 oranında ve sonbahar mevsiminde %24,6 oranında saptanmıştır (Ozsari ve diğ., 2016).

İstanbul'un Yeditepe Hastanesi'ne başvuran toplam 644 hastasında farklı akut gastroenterit ajanlarının varlığı analiz edilmiştir. Hastanenin pediatrik acil ünitesinden alınan dışkı numunelerinde rotavirus, norovirus ve adenovirusun varlığı kalitatif immüno-kromatografik analiz vasıtasıyla test edilmiştir. Rotavirusun, %12,7 oranıyla (75/588 numunede), en yaygın patojen olduğu saptanmıştır. Norovirus 51/520 numunede (%9,8) bulunmuş ve ikinci etyolojik ajanı olarak kabul edilmiştir. Adenovirus %4,7 oranında (28/594 numunede) tespit edilmiştir (Bicer ve diğ., 2014).

Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Acil Polikliniği'ne Ekim 2012 – Ocak 2013 arasında akut ishalle başvuran 126 çocuktan dışkı örnekleri alınmış ve ELİSA yöntemi kullanılarak rotavirus, adenovirus ve norovirus pozitifliği araştırılmıştır. Ayrıca, başvuran hastaların yaş, kardeş sayısı, toplu ortamda bulunma ve aşılama durumu sorgulanmış ve ateş, karın ağrısı, kusma ve ishal sıklığı ve süresi gibi klinik belirtileri kaydedilmiştir. Hastaların klinik ağırlık skorlamaları hesaplanarak etken viruslar arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

Hastaların %18,2'sinde rotavirus, %10,3'ünde adenovirus ve %8,7'sinde norovirus saptanmıştır. Her üç virusun en fazla 1-5 yaş arasında gözlenmiştir. Norovirusun ortalama yaşı daha düşük saptanmıştır. Viral gastroenterit etkenlerinin ateş derecesi, ishal-kusma süresi ve sıklığı, dehidratasyon derecesi ve tedavisini oluşturan klinik skorlamasında her üç viral etken de orta derecede klinik ağırlığa sahipti. Adenovirusta kısmen daha ağır klinik skorlama saptanırken diğer ishal etkenleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Beş yaş ve altı çocuklarda rotavirus aşılama oranı ise %20 olarak saptanmıştır (Yılmaz, 2013).

Diğer bir çalışmada, İzmir'in Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde bulunan hastalardan dışkı numuneleri toplanıp, ticari immunkromatografik enzim immuno test kitleri kullanılarak, rotavirus ve adenovirusun varlığı araştırılmıştır. Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Enfeksiyöz Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarından Mayıs 2008 – Mayıs 2010 arasında toplanan toplam 1112 numunenin 201'i (18,07%) rotavirus ve 14'ü (1,2%) adenovirus antijeni için pozitif olduğu ortaya koyulmuştur. Toplam 610 numune erkeklerden ve 502 numune kadınlardan alınmıştır. Yaş aralığı 0-85 arasında değişiyordu. Toplam 821 dışkı numunesi 0-3 yaş arasındaki hastalarından toplanmıştır (Ece ve diğ., 2012).

Yoğun nüfuslu İstanbul Şehiri'nde atık suların miktarı yüksek olması beklenilmektedir. Kirli atık suların denize atılması ve bu şekilde deniz kıyılarının bulaşması yapılan çalışmanın kapsamında midyelerde elde edilen yüksek sonuçların sebebi olması muhtemeldir.

İstanbul'da bir balıkçı teknesi, bir balıkçı dükkânı ve lokanta'dan alınan midye numunelerinde yüksek oranda adenovirus ve astrovirus saptanmış olması, İstanbul'un kıyılarından toplanan midyelerin araştırılan enterik viruslar ve hatta muhtemelen diğer enterik viruslarla geniş bir şekilde bulaşmış olduğu ve bu durum genel halk sağlığı için riski oluşturduğuna işaret etmektedir. Türkiye'de hastanelerde, gastroenteritli hastalarda enterovirusların sorun olduğu çok sayıda çalışma ile saptanmıştır.

Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, kabuklu deniz hayvanları satılan lokantalar ve işyerlerinde bu hayvanların iyice temizlemesi ve doğru şekilde pişirilmesi hakkında farkındalığının artırılması gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından faydalı olacaktır. Kötü hijyen uygulamaları, uygunsuz gıda işleme ile birlikte hazır gıdalarda ve kabuklu deniz ürünleri gibi az pişirilmiş gıdalarda kontaminasyona neden olmaktadır. Kabuklu

deniz hayvanlarında enterik virusların çapraz kontaminasyonu konusuna dikkat çekilmesi, bu sebeple ortaya çıkabilecek hastalıkların önlenmesi gıda güvenliği ve dolayısıyla sağlık açısından oldukça önemlidir.





KAYNAKÇA

Abad, FX, Pintó, RM, Diez, JM & Bosch, A 1994, 'Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 7, pp. 2377-2383.

Abad, FX, Pintó, RM, Gajardo, R & Bosch, A 1997a, 'Viruses in mussels: public health implications and depuration', *Journal of Food Protection*, vol. 60, no. 6, pp. 677-681.

Abad, FX, Pintó, RM, Villena, C, Gajardo, R & Bosch, A 1997b, 'Astrovirus survival in drinking water', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3119-3122.

Abad, FX, Pintó, RM & Bosch, A 1998, 'Flow cytometry detection of infectious rotavirus in clinical and environmental samples', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 7, pp. 2392-2396.

Abad, FX, Villena, C, Guix, S, Caballero, S, Pinto, RM & Bosch, A 2001, 'Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 9, pp. 3904-3907.

Amar, CF, East, CL, Gray, J, Iturriza-Gomara, M, Maclure, EA & McLauchlin J 2007, 'Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English casecontrol Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996)', *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, vol. 26, no. 5, pp. 311-323.

Ansari, SA, Springthorpe, VS & Sattar, SA 1991, 'Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks', *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 13, no. 3, pp. 448-461.

Appleton, H 2001, 'Norwalk virus and the small round viruses causing foodborne gastroenteritis', in *Foodborne Disease Handbook: Viruses, Parasites, Pathogens and HACCP*, 2nd ed., vol. 2 (Hui, YH, Sattar, SA, Murrell, KD, Nip, WK & Stanfield, PS eds.), CRC Press, pp. 77-97.

Atmar, RL, Metcalf, T, Neill, F & Estes, M 1993, 'Detection of enteric viruses in oysters by using PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 2, pp. 631-635.

Atmar, RL, Neill, FH, Romalde, JL, Le Guyader, F, Woodley, CM, Metcalf, TG & Estes, MK 1995, 'Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish with the PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 8, pp. 3014-3018.

Atmar, RL, Neill, FH, Woodley, CM, Manger, R, Fout, GS, Burkhardt, W, Leja, L, McGovern, ER, Le Guyader, F, Metcalf, TG & Estes MK 1996, 'Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 1, pp. 254-258.

Atmar, RL 2006, 'Molecular Methods of Virus Detection in Foods', in Goyal SM (ed.), *Viruses in Foods*, Springer-Verlag US, pp. 121-149.

Baert, L, Debevere, J & Uyttendaele, M 2009, 'The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, no. 2-3, pp. 83-94.

Bagci, S, Eis-Hubinger, AM, Yassin, AF, Simon, A, Bartmann, P, Franz, AR & Mueller, A 2010, 'Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 29, no. 9, pp. 1079-1084.

Bajolet, O & Chippaux-Hyppolite, C 1998, 'Rotavirus and other viruses of diarrhea', *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 91, no. 5, pp. 432-437.

Barrella, KM, Garrafa, P, Monezi, TA, Hársi, CM, Salvi, C, Violante, PA & Mehnert, DU 2009, 'Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo', *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, no. 1, pp. 102-107.

Beller, M, Ellis, A, Lee, SH, Drebot, MA, Jenkerson, SA, Funk, E, Sobsey, MD, Simmons III, OD, Monroe, SS, Ando, T, Noel, J, Petric, M, Hockin, J, Middaugh, JP & Spika, JS 1997, 'Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well—International consequences', *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*, vol. 278, no. 7, pp. 563-568.

Bicer, S, Col, D, Ciler Erdag, G, Giray, T, Gurol, Y, Yilmaz, G, Vitrinel, A & Ozelgun, B 2014, 'A retrospective analysis of acute gastroenteritis agents in children admitted to a university hospital pediatric emergency unit', *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 7, no. 4, pp. e9148.

Bidawid, S, Farber, JM & Sattar, SA 2000, 'Contamination of foods by foodhandlers: Experiments on hepatitis A virus transfer and its interruption', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 7, pp. 2759-2763.

Bidawid, S, Malik, N, Adegbunrin, O, Sattar, SA & Farber, JM 2004, 'Norovirus cross-contamination during food handling and interruption of virus transfer by hand antisepsis: experiments with feline calicivirus as a surrogate', *Journal of Food Protection*, vol. 67, no. 1, pp. 103-109.

Boom, R, Sol, CJA, Salimans, MMM, Jansen, CL, Wertheim van Dillen, PME & Van der Noordaa, J 1990, 'Rapid and simple method for purification of nucleic acids', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 28, no. 3, pp. 495-503.

Boone, SA & Gerba, CP 2007, 'Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 6, pp. 1687-1696.

Bosch, A, Pintó, RM, Blanch, AR & Jofre, J 1988, 'Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures', *Water Research*, vol. 22., no. 3, pp. 343-348.

Bosch, A 1998, 'Human enteric viruses in the water environment: a minireview', *Internal Microbiology*, vol. 1, no. 3, pp. 191-196.

Bosch, A, Pinto, RM, Comas, J & Abad, FX 2004, 'Detection of infectious rotaviruses by flow cytometry', *Methods in Molecular Biology*, vol. 268, pp. 61-68.

- Bosch, A** 2007, *Human Viruses in Water*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bosch, A, Pinto, RM & Le Guyader, FS** 2009, 'Viral contaminants of molluscan shellfish: detection and characterisation', in *Shellfish Safety and Quality*, Woodhead Publishing Limited, pp. 608.
- Bosch, A, Bidawid, S, Le Guyader, FS, Lees, D & Jaykus, LA** 2011, 'Norovirus and hepatitis A virus in shellfish, soft fruits and water', in *Rapid Detection, Identification, and Quantification of Foodborne Pathogens*, ASM Press, pp. 466.
- Bosch, A, Pinto, RM & Guix, S** 2014, 'Human Astroviruses', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 4, pp. 1048-1074.
- Botero, L, Montiel, M & Portoa, L** 1996, 'Enteroviruses in shrimp harvested from contaminated marine waters', *International Journal of Environmental Health Research*, vol. 6, no. 2, pp. 103-108.
- Bridger, JC** 1994, 'Non-group A rotaviruses', in Kapikian AZ (eds.), *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, Marcel Dekker – Taylor & Francis, pp. 369–407.
- Buesa, J, Collado, B, Lopez-Andujar, P, Abu-Mallouh, R, Rodriguez Diaz, J, Garcia Diaz, A, Prat, J, Guix, S, Llovet, T, Prats, G & Bosch, A** 2002, 'Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 8, pp. 2854–2859.
- Bull, RA, Tanaka, MM & White, PA** 2007, 'Norovirus recombination', *Journal of General Virology*, vol. 88, no. 12, pp. 3347–3359.
- Caballero, S, Guix, S, El-Senousy, WM, Calico, I, Pinto, RM & Bosch, A** 2003, 'Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains', *Journal of Medical Virology*, vol. 71, no. 2, pp. 245–250.
- Caballero, S, Abad, FX, Loisy, F, Le Guyader, FS, Cohen, J, Pintó, RM & Bosch, A** 2004, 'Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 3904-3909.
- Caddy, S, Breiman, A, Le Pendu, J & Goodfellow, I** 2014, 'Genogroup IV and VI canine noroviruses interact with histo-blood group antigens', *Journal of Virology*, vol. 88, no. 18, pp. 10377-10391.
- Cadilhac, P & Roudot-Thoraval, F** 1996, 'Seroprevalence of hepatitis A virus infection among sewage workers in the Parisian area, France', *European Journal of Epidemiology*, vol. 12, no. 3, pp. 237–240.
- Chadwick, PR, Walker, M & Rees, AE** 1994, 'Airborne transmission of a small round structured virus', *Lancet*, vol. 343, no. 8890, pp. 171.
- Chappe, C, Minjolle, S, Dabadie, A, Morel, L, Colimon, R & Pladys, P** 2012, 'Astrovirus and digestive disorders in neonatal units', *Acta Paediatrica*, vol. 101, no. 5, pp. 208–212.
- Cheong, S, Lee, C, Song, SW, Choi, WC, Lee, CH & Kim, SJ** 2009, 'Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 24, pp. 7745-7751.

- Clark, B & Mckendrick, M** 2004, 'A review of viral gastroenteritis', *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 17, no. 5, pp. 461-469.
- Cline, J, Braman, JC & Hogrefe, HH** 1996, 'PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases', *Nucleic Acids Research*, vol. 24, no. 18, pp. 3546-3551.
- Cliver, DO** 1997, 'Virus transmission via food', *Food Technology*, vol. 51, no. 4, pp. 71-78.
- Colquhoun, DR, Schwab, KJ, Cole, RN & Halden, RU** 2006, 'Detection of norovirus capsid protein in authentic standards and in stool extracts by matrix assisted laser desorption and nanospray mass spectrometry', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 4, pp. 2749-2755.
- Cook, SM, Glass, RI, LeBaron, CW & Ho, MS** 1990, 'Global seasonality of rotavirus infections', *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 68, no. 2, pp. 171-177.
- Cook, N** 2001, 'Viruses in food', *CPD Infection*, vol. 2, pp. 98-101.
- Cook, N, Bridger, J, Kendall, K, Gomara, MI, El-Attar, L & Gray, J** 2004, 'The zoonotic potential of rotavirus', *The Journal of Infection*, vol. 48, no. 4, pp. 289-302.
- Craun, GF** 1991, 'Causes of waterborne outbreaks in the United States', *Water Science & Technology*, vol. 24, no. 2, pp. 17-20.
- Crawford, SE, Labbe, M, Cohen, J, Burroughs, MH, Zhou, HJ & Estes, MK** 1994, 'Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells', *Journal of Virology*, vol. 68, no. 9, pp. 5945-5922.
- Da Silva Soares, L, De Fátima, SG, Socorro, LO, Silva, SF, Fátima, CMEM, Mascarenha, JD & Linhares, AC** 2014, 'Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype', *Journal of Medical Virology*, vol. 86, no. 6, pp. 1065-1072.
- de Wit, MA, Koopmans, MP, Kortbeek, LM, Wannet, WJ, Vinje, J, van Leusden, F, Bartelds, AI & van Duynhoven, YT** 2001, 'Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in The Netherlands: incidence and etiology', *American Journal of Epidemiology*, vol. 154, no. 7, pp. 666-674.
- de Wit, MA, Koopmans, MPG & Van Duynhoven, Y** 2003, 'Risk factors for Norovirus, Sapporo-virus, and Group A rotavirus gastroenteritis', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, no. 12, pp. 1563-1570.
- Deng, MY, Day, SP & Cliver, DO** 1994, 'Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 6, pp. 1927-1933.
- Dennehy, PH** 2000, 'Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 19, no. 10, pp. 103-105.
- Dennehy, PH** 2008, 'Rotavirus Vaccines: an Overview', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 1, p. 198-208.
- DePaola, A, Jones, JL, Woods, J, Burkhardt, W III, Calci, KR, Krantz, JA, Bowers, JC, Kasturi, K, Byars, RH, Jacobs, E, Williams-Hill, D & Nabe, K** 2010, 'Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 9, pp. 2754-2768.

- Di Pinto, A, Conversano, MC, Forte, VT, La Salandra, G, Montervino & C, Tantillo, GM** 2004, 'A comparison of RT-PCR-based assays for the detection of HAV from shellfish', *New Microbiologica*, vol. 27, no. 2, pp. 119–124.
- Dienstag, JL, Gust, ID, Lucas, CR, Wong, DC & Purcell, RH** 1976, 'Mussel-associated viral hepatitis, type A: Serological confirmation', *The Lancet*, vol. 307, no. 7959, pp. 561–563.
- DiGirolamo, R, Liston, J & Matches, JR** 1970, 'Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters', *Applied Microbiology*, vol. 20, no. 1, pp. 58–63.
- DiGirolamo, R, Wiczynski, L, Daley, M & Miranda, F** 1972, 'Preliminary observations on the uptake of poliovirus by west coast shore crabs', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 23, no. 1, pp. 170–171.
- Directorate, G., Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health**, 2002, *Scientific opinion on Norwalk-like viruses*, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, pp. 5–52.
- Ece, G, Samlioglu, P, Ulker, T, Kose, S & Ersan, G** 2012, 'Rotavirus and adenovirus prevalence at Tepecik education and research hospital (Turkey)', *Le Infezioni in Medicina*, vol. 20, no. 2, pp. 100–104.
- Elamri, DE, Aouni, M, Parnaudeau, S & Le Guyader, FS** 2006, 'Detection of human enteric viruses in shellfish collected in Tunisia', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 399.
- El-Senousy, WM, Guix, S, Abid, I, Pinto, RM & Bosch, A** 2007, 'Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 1, pp. 164–167.
- Enriquez, CE, Hurst, CJ & Gerba, CP** 1995, 'Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water', *Water Research*, vol. 29, no. 11, pp. 2548–2553.
- Erol, N, Delibaş, SB, Özkoç, S, Ergüden, C & Aksoy, Ü** 2016, 'Investigation of parasitic and viral pathogens in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Gulf of Izmir, Turkey', *Saudi Medical Journal*, vol. 37, no. 6, pp. 703–706.
- Fankhauser, RL, Monroe, SS, Noel, JS, Humphrey, CD, Bresee, JS, Parashar, UD, Ando, T & Glass, RI** 2002, 'Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 186, no. 1, pp. 1–7.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]** 2008, *Viruses in Food: Scientific Advice to Support Risk Management Activities: Meeting Report*, the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, pp. 5–17.
- Farthing, MJG** 1989, *Viruses and the Gut*, Welwyn Garden City, Hertfordshire, Smith Kline & French Ltd.
- Fiore, AE, Wasley, A & Bell BP** 2006, *Prevention of hepatitis a through active or passive immunization*, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report no. 55 (RR07), pp. 1–23.

Formiga-Cruz, M, Tofino-Quesada, G, Bofill-Mas, S, Lees, DN, Henshilwood, K, Allard, AK, Conden-Hansson, AC, Hernroth, BE, Vantarakis, A, Tsibouxi, A, Papapetropoulou, M, Furones, MD & Girones, R 2002, 'Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 12, pp. 5990–5998.

Fumian, TM, Vieira, CB, Leite, JP & Miagostovich, MP 2013, 'Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil', *Journal of Water and Health*, vol. 11, no. 1, pp. 110-119.

Fusco, G, Bartolo, ID, Cioffi, B, Ianiro, G, Palermo, P, Monini, M & Amoroso, MG 2017, 'Prevalence of foodborne viruses in mussels in southern Italy', *Food and Environmental Virology*, vol. 9, no. 2, pp. 187-194.

Gallimore, CI, Taylor, C, Gennery, AR, Cant, AJ, Galloway, A, Lewis, D & Gray, JJ 2005, 'Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 8, pp. 3890–3894.

Gard, S 1957, 'Discussion', in Hartman FW (eds.), *Hepatitis Frontiers*, Little Brown & Co., Boston, pp. 241-243.

Gassilloud, B, Schwartzbrod, L & Gantzer, B 2003, 'Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk?', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 7, pp. 3965-3969.

Gaulin, C, Frigon, M, Poirier, D & Fournier, C 1999, 'Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre symptomatic phase of illness', *Epidemiology and Infection*, vol. 123, no. 3, pp. 475–478.

Ghebremedhin, B 2014, 'Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance', *European Journal of Microbiology & Immunology*, vol. 4, no. 1, pp. 26-33.

Girones, R, Puig, M, Allard, A, Lucena, F, Wadell, G & Jofre, J 1995, 'Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters', *Water Science and Technology*, vol. 31, no. 5-6, pp. 351–357.

Glass, RI, Bresee, J, Jiang, B, Gentsch, J, Ando, T, Fankhauser, R, Noel, J, Parashar, U, Rosen, B & Monroe, SS 2001, 'Gastroenteritis viruses: an overview', *Novartis Foundation Symposium*, vol. 238, pp. 5–19.

Gofti-Laroche, L, Gratacap-Cavallier, B, Demanse, D, Genoulaz, O, Seigneurin, JM & Zmirou D 2003, 'Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)?', *Journal of Clinical Virology*, vol. 27, no. 1, pp. 74–82.

Goyal, SM 2006, 'Methods of Virus Detection in Foods', in Goyal SM (ed.), *Viruses in Foods*, Springer-Verlag US, pp. 101-119.

Graff, J, Ticehurst, J & Flehmig, B 1993, 'Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 10, pp. 3165-3170.

Greening, GE 2006, 'Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses)', in Goyal SM (ed.), *Viruses in Foods*, Springer-Verlag US, pp. 5-42.

- Gregory, JB, Litaker, RW & Noble, RT** 2006, 'Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 6, pp. 3960–3967.
- Grohmann, GS, Murphy, AM, Christopher, PJ, Auty, E & Greenberg, HB** 1981, 'Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters', *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, vol. 59, no. 2, pp. 219-228.
- Hall, AJ, Rosenthal, M & Gregoricus, N** 2011, 'Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 8, pp. 1381-1388.
- Halliday, ML, Kang, LY, Zhou, TK, Hu, MD, Pan, QC, Fu, TY, Huang, YS & Hu, SL** 1991, 'An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 164, no. 5, pp. 852-859.
- Ham, H, Oh, S, Jang, J, Jo, S, Choi, S & Pak, S** 2014, 'Prevalence of human astrovirus in patients with acute gastroenteritis', *Annals of Laboratory Medicine*, vol. 34, no. 2, pp. 145-147.
- Hartmann, NM, Dartscht, M, Szewzyk, R & Selinka, HC** 2013, 'Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses', *Virology Journal*, vol. 10, pp. 190.
- Hasing, ME, Lee, BE, Preiksaitis, JK, Tellier, R, Honish, L, Senthilselvan, A & Pang, XL** 2013, 'Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 7, pp. 2204-2211.
- Hejkal, TW & Gerba, CP** 1981, 'Uptake and survival of enteric viruses in the blue crab, *Gallinetes sapidus*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 41, no. 1, pp. 207-211.
- Hird, TR & Grassly, NC** 2012, 'Systematic review of mucosal immunity induced by oral and inactivated Poliovirus vaccines against virus shedding following oral Poliovirus challenge', *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 4, e1002599.
- Horwitz, MS** 2001, 'Adenoviruses', in Knipe, DM & Howley, M (ed.), *Fields Virology – 4th. Edition*, Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia, PA, pp.2301–2326.
- Hutson, AM, Atmar, RL & Estes, MK** 2004, 'Norovirus disease: Changing epidemiology and host susceptibility factor', *Trends in Microbiology*, vol. 12, no. 6, pp. 279–287.
- Iturriza-Gomara, M, Isherwood, B, Desselberger, U & Gray, J** 2001, 'Reassortment in vivo: driving force for diversity of human Rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999', *Journal of Virology*, vol. 75, no. 8, pp. 3696–3705.
- Jaykus, LA, Hemard, MT & Sobsey, MD** 1994, 'Human enteric pathogenic viruses', in Pierson MD & Hackney CR (eds.), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*, Springer US, pp. 92–153.
- Jaykus, LA, De Leon, R & Sobsey, MD** 1996, 'A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 2074-2080.

- Jean, J, D'Souza, D & Jaykus, LA** 2004, 'Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 11, pp. 6603–6610.
- Jin, Y, Zhang, RF, Xie, ZP, Yan, KL, Gao, HC, Song, JR, Yuan, XH, Hou, YD & Duan, ZJ** 2013, 'Prevalence of adenovirus in children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China', *Virology Journal*, vol. 10, pp. 271.
- Kapikian, AZ, Hoshino, Y & Chanock, RM** 2001, 'Rotaviruses', in Knipe DM & Howley PM (eds.), *Fields Virology*, 4th ed., vol. 2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1787–1833.
- Kingsley, DH & Richards, GP** 2001, 'Rapid and efficient extraction method for reverse Transcription-PCR detection of hepatitis A and norwalk-like viruses in shellfish', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 9, pp. 4152–4157.
- Kingsley, DH, Hoover, DG, Papafragkou, E & Richards, GP** 2002, 'Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure', *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 10, pp. 1605–1609.
- Kirkland, KB, Meriwether, RA, Leiss, JK & Mac Kenzie, WR** 1996, 'Steaming oysters does not prevent Norwalk-like gastroenteritis', *Public Health Reports*, vol. 111, no. 6, pp. 527–530.
- Kitahashi, T, Tanaka, T & Utagawa, E** 1999, 'Detection of HAV, SRSV and astrovirus genomes from native oysters in Chiba City, Japan', *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, vol. 73, no. 6, pp. 559–564.
- Kitamoto, NK, Ramig, RF, Matson, DO & Estes, MK** 1991, 'Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2 and CaCo-2)', *Virology*, vol. 184, no. 2, pp. 729-737.
- Koff, RS, Grady, GF, Chalmers, TC, Mosley, JW, Swartz, BL & the Boston Inter-hospital Liver Group** 1967, 'Viral hepatitis in a group of Boston hospitals. III. Importance of exposure to shellfish in a nonepidemic period', *the New England Journal of Medicine*, vol. 276, no. 13, pp. 703-710.
- Kohn, MA, Farley, TA, Ando, T, Curtis, M, Wilson, SA, Jin, Q, Monroe, SS, Baron, RC, McFarland, LM & Glass, RI** 1995, 'An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds', *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*, vol. 273, no. 19, pp. 1492.
- Koopmans, M, Vinje, J, Duizer, E, De Wit, M & Van Duynhoven, Y** 2001, 'Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands', *Novartis Foundation Symposium*, vol. 238, pp. 197–214.
- Koopmans, M & Duizer, E** 2004, 'Foodborne viruses: an emerging problem', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 90, no. 1, pp. 23–41.
- Koopmans, M, Cliver, DO & Bosch, A** 2008, *Foodborne Viruses: Progress and Challenges*, ASM Press, Washington, DC, USA.
- Kuiken, T, Rimmelzwaan, G, van Riel, D, van Amerongen, G, Baars, M, Fouchier, R & Osterhaus, A** 2004, 'Avian H5N1 influenza in cats', *Science*, vol. 306, no. 5694, pp. 241.

Kurtz, JB & Lee, TW 1987, 'Astroviruses: human and animal', *Ciba Foundation Symposium*, vol. 128, pp. 92–107.

La Rosa, G, Fontana, S, Di Grazia, A, Iaconelli, M, Pourshaban, M & Muscillo, M 2007, 'Molecular identification and genetic analysis of Noroviruses genogroups I and II in water environment: comparative analysis of different RT-PCR assays', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 13, pp. 4152–4161.

Laverick, MA, Wyn-Jones, AP & Carter, M 2004, 'Quantitative RT-PCR for the enumeration of Noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 127–136.

Lawton, JA, Zeng, CQ, Mukherjee, SK, Cohen, J, Estes, MK & Prasad, BV 1997, 'Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer', *Journal of Virology*, vol. 71, no. 10, pp. 7353-7360.

Le Cann, P, Ranarijaona, S, Monpoeho, S, Le Guyader, F & Ferre, V 2004, 'Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR', *Research in Microbiology*, vol. 155, no. 1, pp. 11–15.

Le Guyader, F, Haugarreau, L, Miossecm, L, Dubois, E & Pommepuy, M 2000, 'Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 8, p. 3241–3248.

Le Guyader, FS, Schultz, AC, Haugarreau, L, Croci, L, Maunula, L, Duizer, E, Lodder-Verschoor, F, von Bonsdorff, CH, Suffredini, E, van der Poel, WMM, Reymundo, R & Koopmans, M 2004, 'Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce', *Journal of Food Protection*, vol. 67, no. 10, pp. 2315–2319.

Le Guyader, FS, Bon, F, DeMedici, D, Parnaudeau, S, Bertone, A, Crudeli, S, Doyle, A, Zidane, M, Suffredini, E, Kohli, E, Maddalo, F, Monini, M, Gallay, A, Pommepuy, M, Pothier, P & Ruggeri, FM 2006, 'Detection of multiple Noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 11, pp. 3878–3882.

Lee, SH & Kim, SJ 2002, 'Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea', *Water Research*, vol. 36, no. 1, pp. 248-256.

Lees, DN, Henshilwood, K & Dore, WJ 1994, 'Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 8, pp. 2999-3005.

Lees, D 2000, 'Viruses and bivalve shellfish', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 59, no. 1-2, pp. 81–116.

Leggitt, PR & Jaykus, LA 2000, 'Detection methods for human enteric viruses in representative foods', *Journal of Food Protection*, vol. 63, no. 12, pp. 1738–1744.

Lewis, GD & Metcalf, TG 1988, 'Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 8, pp. 1983–1988.

Loisy, F, Le Cann, P, Pommepuy, M & Le Guyader, F 2000, 'An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 31, no. 6, pp. 411-415.

- López-Sabater, EI, Deng, MY & Cliver, DO** 1997, 'Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*)', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 24, no. 2, pp. 101-104.
- Luz, RB, Staggemeier, R, Fabres, RB, Soliman, MC, Souza, FG, Gonçalves, R, Fausto, IV, Rigotto, C, Heinzelmann, LS, Henzel, A, Fleck, JD & Spilki, FR** 2015, 'Bioaccumulation of animal adenoviruses in the pink shrimp', *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 3, pp. 715-723.
- Mackay, IM, Arden, KE & Nitsche, A** 2002, 'Real-time PCR in virology', *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 6, pp. 1292-1305.
- Madeley, CR & Cosgrove, BP** 1975, 'Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis', *Lancet*, vol. 2, no. 7932, pp. 451-452.
- Marks, PJ, Vipond, IB, Carlisle, D, Deakin, D, Fey, RE & Caul, EO** 2000, 'Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant', *Epidemiology and Infection*, vol. 124, no. 3, pp. 481-487.
- Mase, M, Eto, M, Tanimura, N, Imai, K, Tsukamoto, K, Horimoto, T, Kawaoka, Y & Yamaguchi, S** 2005, 'Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China', *Virology*, vol. 339, no. 1, pp. 101-109.
- Matsuda, H, Okada, K, Takahashi, K & Mishiro, S** 2003, 'Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar', *Journal of Infectious Diseases*, vol. 188, no. 6, pp. 944.
- Matsui, SM & Greenberg, HB** 1994, 'Medical management of foodborne viral gastroenteritis', in Hui YH, Gorham JR, Murrell KD & Cliver DOE (ed.), *Foodborne Disease Handbook, vol. 2. Diseases Caused by Viruses, Parasites, and Fungi*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 145-158.
- Matsumoto, K, Hatano, M, Kobayashi, K, Hasegawa, A, Yamazaki, S, Nakata, S, Chiba, S & Kimura Y** 1989, 'An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren', *Journal of Infectious Diseases*, vol. 160, no. 4, pp. 611-615.
- Maunula, L, Kalso, S, Von Bonsdorff, CH & Pönkä, A** 2004, 'Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak', *Epidemiology and Infection*, vol. 132, no. 4, pp. 737-743.
- McKinney, KR, Gong, YY & Lewis, TG** 2006, 'Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens', *Journal of Environmental Health*, vol. 68, no. 9, pp. 26-30.
- Mead, PS, Slutsker, L, Dietz, V, McCaig, LF, Bresee, JS, Shapiro, C, Griffin, PM & Tauxe, RV** 1999, 'Food-related illness and death in the United States', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, no. 5, pp. 607-625.
- Mehndiratta, MM, Mehndiratta, P & Pande, R** 2014, 'Poliomyelitis: historical facts, epidemiology, and current challenges in eradication', *The Neurohospitalist*, vol. 4, no. 4, pp. 223-229.
- Meliopoulos, VA, Marvin, SA, Freiden, P, Moser, LA, Nighot, P, Ali, R, Bliklager, A, Reddivari, M, Heath, RJ, Koci, MD & Schultz-Cherry, S** 2016, 'Oral administration of astrovirus capsid protein is sufficient to induce acute diarrhea in vivo', *mBio*, vol. 7, no. 6, pp. 01494-16.

Mendez, E & Arias, CF 2007, 'Astroviruses', in Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed.), *Fields Virology*, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 981–1000.

Mendez-Toss, M, Griffin, DD, Calva, J, Contreras, JF, Puerto, FI, Mota, F, Guiscafre, H, Cedillo, R, Munoz, O, Herrera, I, Lopez, S & Arias, CF 2004, 'Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 1, pp. 151–157.

Miagostovich, MP, Ferreira, FF, Guimarães, FR, Fumian, TM, Diniz-Mendes, L, Luz, SL, Silva, LA & Leite, JP 2008, 'Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 2, pp. 375–382.

Mikkelsen, P & Bieler, R 2008, *Seashells of Southern Florida: Living Marine Mollusks of the Florida Keys and Adjacent Regions, Bivalves*, Princeton, Princeton University Press, New Jersey, USA.

Mitchell, DK, Monroe, SS, Jiang, X, Matson, DO, Glass, RI & Pickering, LK 1995, 'Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 172, no. 6, pp. 1437–1444.

Mohan, V, Rawat, S, Lokesh, KM, Mohan, HV, Avinash Reddy, D, Kumar, A & Bhilegaonkar, KN 2014, 'Prevalence of Rotavirus in shellfish from Southern Kerala', *Veterinary World*, vol. 7, no. 10, pp. 821–824.

Moresco, V, Viancelli, A, Nascimento, MA, Souza, DS, Ramos, AP, Garcia, LA, Simões, CM & Barardi, CR 2012, 'Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil', *Marine Pollution Bulletin*, vol. 64, no. 1, pp. 40–48.

Moser, LA, Carter, M & Schultz-Cherry, S 2007, 'Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication', *Journal of Virology*, vol. 81, no. 21, pp. 11937–11945.

Muniain-Mujika, I, Calvo, M, Lucena, F & Girones, R 2003, 'Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 83, no. 1, pp. 75–85.

Myers, TW & Gelfand, DH 1991, 'Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase', *Biochemistry*, vol. 30, no. 31, pp. 7661–7666.

Myrmel, M, Berg, EM, Rimstad, E & Grinde, B 2004, 'Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 5, pp. 2678–2684.

Myrmel, M, Berg, EMM, Grinde, B & Rimstad, E 2006, 'Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants', *Journal of Water and Health*, vol. 4, no. 2, pp. 197–209.

Oishi, I, Yamazaki, K, Kimoto, T, Minekawa, Y, Utagawa, E, Yamazaki, S, Inouye, S, Grohmann, GS, Monroe, SS, Stine, SE, Carcamo, C, Ando, T & Glass, RI 1994, 'A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among

students and teachers in Osaka, Japan', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 170, no. 2, pp. 439–443.

Okitsu-Negishi, S, Nguyen, TA, Phan, TG & Ushijima, H 2004, 'Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia', *Pediatrics International*, vol. 46, no. 2, pp. 245–252.

Ozsari, T, Bor G, Kaya B & Yakut, K 2016, 'The prevalence of rotavirus and adenovirus in the childhood gastroenteritis', *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 9, no. 6, pp. e34867.

Pang, XL, Honma, S, Nakata, S & Vesikari, T 2000, 'Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, no. 2, pp. 288–294.

Patel, MM, Hall, AJ, Vinjé, J & Parashar, UD 2009, 'Noroviruses: a comprehensive review', *Journal of Clinical Virology*, vol. 44, no. 1, pp. 1-8.

Patel, MM, Glass, R, Desai, R, Tate, JE & Parashar, UD 2012, 'Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure?', *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 12, no. 7, pp. 561–570.

Pina, S, Puig, M, Lucena, F, Jofre, J & Girones, R 1998, 'Viral pollution in the environment and in shellfish – human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 9, pp. 3376–3382.

Pintó, RM, Abad, FX, Gajardo, R & Bosch, A 1996, 'Detection of infectious astroviruses in water', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 5, pp. 1811–1813.

Pintó, RM & Bosch, A 2008, 'Rethinking virus detection in food', in Koopmans M, Cliver DO, Bosch A (ed.), *Foodborne viruses: progress and challenges*, ASM Press, Washington, DC, pp. 171–188.

Ponka, A, Maunula, L, von Bonsdorff, CH & Lyytikäinen, O 1999, 'An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries', *Epidemiology and Infection*, vol. 123, no. 3, pp. 469–474.

Portes, SAR, Lanzarini, NM, Vieira, CB, Fernandes, J, Silva, ADS, de Oliveira, RC, da Costa, EV, de Lemos, ERS & Fumian, TM 2016, 'Viruses in mass gatherings: viral waterborne and foodborne diseases', *Virus Reviews & Research – Journal of the Brazilian Society for Virology*, vol. 21, no. 2, pp. 32-40.

Power, UF & Collins, JK 1989, 'The production of microbiologically safe shellfish – lessons from the classification of shellfish at source', *Environmental Health*, vol. 97, pp. 124-130.

Prado, T & Miagostovich, MP 2014, '[Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review]', *Cadernos de Saude Publica*, vol. 30, no. 7, pp. 1367-1378.

Promkuntod, N, Antarasena, C & Prommuang, P 2006, 'Isolation of avian influenza virus A subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak', *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1081, pp. 171–173.

- Rabenau, HF, Sturmer, M, Buxbaum, S, Walczok, A, Preiser, W & Doerr, HW** 2003, 'Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best?', *Intervirology*, vol. 46, no. 4, pp. 232–238.
- Rackoff, LA, Bok, K, Green, KY & Kapikian, AZ** 2013, 'Epidemiology and evolution of rotaviruses and noroviruses from an archival WHO Global Study in Children (1976-1979) with implications for vaccine design', *PLoS One*, vol. 8, no. 3, e59394.
- Reuter, G, Vennema, H, Koopmans, M & Szücs, G** 2006, 'Epidemic spread of recombinant Noroviruses with four capsid types in Hungary', *Journal of Clinical Virology*, vol. 35, no. 1, pp. 84–88.
- Rezig, D, Bahri, O, Ben Ayed, N, Ben Yahia, A, Sadraoui, A, Ayed, S & Triki, H** 2006, 'Identification of adenoviruses serotypes implicated in haemorrhagic conjunctivitis in Tunisia', *Pathologie Biologie (Paris)*, vol. 54, pp. 561-565.
- Richards, GP** 1987, 'Shellfish-associated enteric virus illness in the United States, 1934–1984', *Estuaries*, vol. 10, no. 1, pp. 84–85.
- Richards, GP** 2001, 'Enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 27, no. 2, pp. 117–125.
- Richards, GP** 2006, 'Shellfish-Associated Viral Disease Outbreaks', in Goyal SM (ed.), *Viruses in Foods*, Springer-Verlag US, pp. 223-238.
- Rockx, B, de Wit, M, Vennema, H, Vinjé, J, de Bruin, E, van Duynhoven, Y & Koopmans, M** 2002, 'Natural history of human Calicivirus infection: A prospective cohort study', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 35, no. 3, pp. 246–253.
- Romalde, JL, Estes, MK, Szucs, G, Atmar, RL, Woodley, CM & Metcalf, TG** 1994, 'In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 6, pp. 1921–1926.
- Ruiz-Palacios, GM, Perez-Schael, I, Velazquez, FR, Abate, H, Breuer, T, Clemens, SC, Chevart, B, Espinoza, F, Gillard, P, Innis, BL, Cervantes, Y, Linhares, AC, López, P, Macías-Parra, M, Ortega-Barría, E, Richardson, V, Rivera-Medina, DM, Rivera, L, Salinas, B, Pavía-Ruz, N, Salmerón, J, Rüttimeann, R, Tinoco, JC, Rubio, P, Nuñez, E, Guerrero, ML, Yarzabal, JP, Damaso, S, Tornieporth, N, Sáez-Llorens, X, Vergara, RF, Vesikari, T, Bouckennooghe, A, Clemens, R, De Vos, B & O'Ryan M** 2006, 'Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis', *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 1, pp. 11–22.
- Saiki, RK, Scharf, SJ, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA & Arnheim, N** 1985, 'Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, vol. 230, no. 4732, pp. 1350–1354.
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Mullis, KB, Horn, GT & Ehrlich, HA** 1988, 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491.
- Sair, AI, D'Souza, DH, Moe, CL & Jaykus, LA** 2002, 'Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR', *Journal of Virological Methods*, vol. 100, no. 1-2, pp. 57–69.

Sawyer, LA, Murphy, JJ, Kaplan, JE, Pinsky, PF, Chacon, D, Walmsley, S, Schonberger, LB, Phillips, A, Forward, K & Goldman, C 1988, '25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission', *American Journal of Epidemiology*, vol. 127, no. 6, pp. 1261-1271.

Scallan, E, Hoekstra, RM & Angulo, FJ 2011, 'Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 7-15.

Schwab, KJ, Neill, FH, Fankhauser, RL, Daniels, NA, Monroe, SS, Bergmire-Sweat, DA, Estes, MK & Atmar, RL 2000, 'Development of methods to detect "norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 1, pp. 213-218.

Schwab, KJ, Neill, FH, LeGuyader, F, Estes, MK & Atmar, RL 2001, 'Development of an RT-PCR-DNA enzyme immunoassay for the detection of Norwalk viruses in shellfish', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 2, pp. 742-749.

Shieh, CY-S, Calci, KR & Baric, RS 1999, 'A Method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 11, pp. 4709-4714.

Silva, AK, Saux, JC, Parnaudeau, S, Pommepeuy, M, Elimelech, M & Guyader, FS 2007, 'Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 24, pp. 7891-7897.

Simmonds, P 2006, 'Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses', *Journal of Virology*, vol. 80, no. 22, pp. 11124-11140.

Smith, EM & Gerba, CP 1982, 'Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 1440-1450.

Songserm, T, Jam-on, R, Sae-Heng, N, Meemak, N, Hulse-Post, DJ, Sturm-Ramirez, KM & Webster, RG 2006, 'Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 4, pp. 575-581.

Stafford, R, Strain, D, Heymer, M, Smith, C, Trent, M & Beard, J 1997, 'An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis following consumption of oysters', *Communicable Diseases Intelligence*, vol. 21, no. 21, pp. 317-320.

Stentiford, GD, Bonami, JR & Alday-Sanz, V 2009, 'A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation', *Aquaculture*, vol. 291, no. 1-2, pp. 1-17.

Stupka, JA, Degiuseppe, JI, Parra, GI & Argentinean National Rotavirus Surveillance Network 2012, 'Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains', *Journal of Clinical Virology*, vol. 54, no. 2, pp. 162-167.

- Superti, F, Seganti, L, Orsi, N, Desideri, N, Stein, ML, Tinari, A, Marziano, ML & Donelli, G** 1990, 'In vitro effect of synthetic flavanoids on astrovirus infection', *Antiviral Research*, vol. 13, pp. 201–208.
- Sutter, RW, John, TJ, Jain, H, Agarkhedkar, S, Ramanan, PV, Verma, H, Deshpande, J, Singh, AP, Sreevatsava, M, Malankar, P, Burton, A, Chatterjee, A, Jafari, H & Aylward, RB** 2010, 'Immunogenicity of bivalent types 1 and 3 oral poliovirus vaccine: a randomised, double-blind, controlled trial', *Lancet*, vol. 376, no. 9753, pp. 1682-1683.
- Svensson, L** 2000, 'Diagnosis of foodborne viral infections in patients', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 59, no. 1-2, pp. 117–126.
- Swayne, DE & Beck, JR** 2005, 'Experimental study to determine if low-pathogenicity and highpathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation', *Avian Diseases*, vol. 49, no. 1, pp. 81–85.
- Symes, SJ, Gunesekere, IC, Marshall, JA & Wright, PJ** 2007, 'Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination', *Archives of Virology*, vol. 152, no. 6, pp. 1075–1086.
- Takahashi, K, Kitajima, N, Abe, N & Mishiro, S** 2004, 'Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer', *Virology*, vol. 330, no. 2, pp. 501–505.
- Tate, JE, Burton, AH, Boschi-Pinto, C & Parashar, UD** 2016, 'Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, no. 2, pp. 96–105.
- Tei, S, Kitajima, N, Takahashi, K & Mishiro, S** 2003, 'Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings', *Lancet*, vol. 362, no. 9381, pp. 371–373.
- Tei, S, Kitajima, N, Ohara, S, Inoue, Y, Miki, M, Yamatani, T, Yamabe, H, Mishiro, S & Kinoshita, Y** 2004, 'Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age and sex-matched case-control study', *Journal of Medical Virology*, vol. 74, no. 1, pp. 67–70.
- Terio, V, Martella, V, Moschidou, P, Di Pinto, P, Tantilto, G & Buonavoglia, C** 2010, 'Norovirus in retail shellfish', *Food Microbiology*, vol. 27, no. 1, pp. 29-32.
- Terzi, G, Albayrak, H, Yazici, Z, Gumusova, OS & Celik, TH** 2010, 'First identification of hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus spp.*) in Turkey', *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 9, no. 11, pp. 1584-1587.
- Thurston-Enriquez, JA, Haas, CN, Jacangelo, J & Gerba, CP** 2003a, 'Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 7, pp. 3979–3985.
- Thurston-Enriquez, JA, Haas, CN, Jacangelo, J, Riley, K & Gerba, CP** 2003b, 'Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 1, pp. 577–582.
- Tian, P & Mandrell, R** 2006, 'Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real-time immuno-PCR method', *Journal of Applied Microbiology*, vol. 100, no. 3, pp. 564-574.

Todd, EC, Greig, JD, Bartleson, CA & Michaels, BS 2007, 'Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 2. Description of outbreaks by size, severity, and settings', *Journal of Food Protection*, vol. 70, no. 8, pp. 1975–1993.

Todd, EC & Greig, JD 2015, 'Viruses of foodborne origin: a review', *Virus Adaptation and Treatment – Dove Press Journal*, vol. 7, pp. 25-45.

Traore, O, Arnal, C, Mignotte, B, Maul, A, Laveran, H, Billaudel, S & Schwartzbrod, L 1998, 'Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 8, pp. 3118–3122.

Tsai, YL, Sobsey, MD, Sangermano, LR & Palmer, CJ 1993, 'Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 10, pp. 3488-3491.

Tsai, Y-L, Tran, B & Palmer, CJ 1995, 'Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 1, pp. 363-366.

Tumpey, TM, Suarez, DL, Perkins, LE, Senne, DA, Lee, JG, Lee, YJ, Mo, IP, Sung, HW & Swayne, DE 2002, 'Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat', *Journal of Virology*, vol. 76, no. 12, pp. 6344–6355.

Ueki, Y, Sano, D, Watanabe, T, Akiyama, K & Omura, T 2005, 'Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters', *Water Research*, vol. 39, no. 18, pp. 4271–4280.

Umesha, KR, Bhavani, NC, Venugopal, MN, Karunasagar, I, Krohne, G & Karunasagar, I 2008, 'Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 122, no. 3, pp. 279-286.

van den Berg, H, Lodder, W, van der Poel, W, Vennema, H & de Roda Husman, AM 2005, 'Genetic diversity of Noroviruses in raw and treated sewage water', *Research in Microbiology*, vol. 156, no. 4, pp. 532–540.

Vantarakis, AC & Papapetropoulou, M 1998, 'Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction', *Water Research*, vol. 32, no. 8, pp. 2365–2372.

Vasickova, P, Dvorska, L, Lorenkova, A & Pavlik, I 2005, 'Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature', *Veterinary Medicine*, vol. 50, no. 3, pp. 89–104.

Vega, E, Barclay, L, Gregoricus, N, Shirley, SH, Lee, D & Vinjé, J 2014, 'Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 1, pp. 147-155.

Vesikari, T, Matson, DO, Dennehy, P, Van Damme, P, Santosham, M, Rodriguez, Z, Dallas, MJ, Heyse, JF, Goveia, MG, Black, SB, Shinefield, HR, Christie, CD, Ylitalo, S, Itzler, RF, Coia, ML, Onorato, MT, Adeyi, BA, Marshall, GS,

Gothefors, L, Campens, D, Karvonen, A, Watt, JP, O'Brien, KL, DiNubile, MJ, Clark, HF, Boslego, JW, Offit, PA & Heaton, PM 2006, 'Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine', *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 1, pp. 23–33.

Villar, LM, de Paula, VS, Diniz-Mendes, L, Guimarães, FR, Ferreira, FF, Shubo, TC, Miagostovich, MP, Lampe, E & Gaspar, AM 2007, 'Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, no. 2, pp. 168–173.

Vinje, J, Altena, SA & Koopmans, MP 1997, 'The incidence and genetic variability of small round structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 176, no. 5, pp. 1374–1378.

Votava, M, Cerhnohorska, L, Heroldova, M, Hola, V, Mejzlikova, L, Ondrovčík, P, Ruzicka, F, Dvorackova, M, Woznicova, V & Zahradnický, O 2003, *Special Medical Microbiology* (in Czech), Neptun, Brno, pp. 237–365.

Vu, DL, Bosch, A, Pinto, RM & Guix, S 2017, 'Epidemiology of classic and novel human astrovirus: gastroenteritis and beyond', *Viruses — Open Access Virology Journal*, vol. 9, no. 2, pp. 33.

Walter, JE & Mitchell, DK 2000, 'Role of astroviruses in childhood diarrhea', *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 12, no. 3, pp. 275–279.

WHO (World Health Organization) 2015, 'Public health round-up', *Bulletin of the World Health Organization – May 2015*, vol. 93, no. 5, pp. 285–360.

Wilkinson, N, Kurdziel, AS, Langton, S, Needs, E & Cook, N 2001, 'Resistance of poliovirus to inactivation by hydrostatic pressure', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 2, no. 2, pp. 95–98.

Williams, FP Jr. & Fout, GS 1992, 'Contamination of shellfish by stool-shed viruses: methods of detection', *Environmental Science & Technology*, vol. 26, no. 4, pp. 689–696.

Wood, DJ, Longhurst, D, Killough, RI & David, TJ 1988, 'One-year prospective cross-sectional study to assess the importance of group F adenovirus infections in children under 2 years admitted to hospital', *Journal of Medical Virology*, vol. 26, no. 4, pp. 429–435.

Xia Ming, H, Feng Fan, J, Jun Wu, L & Bo Liang, Y 2013, 'Prevalence of human enteric viruses and a potential indicator of contamination in shellfish in China', *Journal of Food Safety*, vol. 33, no. 2, pp. 209–214.

Yamashita, T, Kobayashi, S, Sakae, K, Nakata, S, Chiba, S, Ishihara, Y, Isomura, S 1991, 'Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 164, no. 5, pp. 954–957.

Yilmaz, H, Bostan, K, Turan, N, Muratoglu, K, Yilmaz, A, Ozkul, AA, Kocazeybek, B & Helps, C 2010, 'Real-time PCR detection of norovirus in mussels collected from the Bosphorus in Istanbul, Turkey', *Food and Environmental Virology*, vol. 2, no. 2, pp. 64–68.

Yilmaz, İ 2013, 'Akut ishallerde çocuklarda nörovirüs, rotavirüs ve adenovirüs sıklığı', *Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.*

Zheng, DP, Ando, T, Fankhauser, RL, Beard, RS, Glass, R & Monroe, SS 2006, 'Norovirus classification and proposed strain nomenclature', *Virology*, vol. 346, no. 2, pp. 312-323.

Internet Kaynakları

Diaz Rengifo, PM 2009, *Utilización del metabisulfito de sodio como preservante en las camaronas (Use of sodium metabisulfite as a preservative in shrimp farms)*, Universidad Agraria Del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias, Guayaquil, Ecuador, viewed 16 July 2017, <<http://www.monografias.com/trabajos81/utilizacion-metabisulfito-sodio-preservante-camaronas/utilizacion-metabisulfito-sodio-preservante-camaronas3.shtml>>.

Gelderblom, HR t.y., *Rotaviren, Vergrößerung 100000-fach, schwere Diarrhoe bei Kindern und Alten; fatale Dehydrierung. Elektronenmikroskopie*, Robert Koch Institut, viewed 13 January 2017, <<http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/R/Rotaviren/Rotaviren.html>>.

Giri, D 2015, *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Procedure, Components, Types and Applications*, Laboratoryinfo.com, viewed 27 February 2017, <<http://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>>.

Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania t.y., *Recombinant adenovirus as seen with transmission electron microscope following negative stain*, Path BioResource – Electron Microscopy Resource Laboratory, viewed 17 January 2017, <<https://pathbio.med.upenn.edu/pbr/portal/hist/F19-aden.html>>.

ViralZone SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) 2015, *Astroviridae*, viewed 17 July 2017, <http://viralzone.expasy.org/27?outline=all_by_species>.

WHO (World Health Organization) 2014, *Health Topics: Hepatitis*, Geneva, Switzerland, viewed 9 December 2014, <<http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>>.

WHO (World Health Organization) 2017, *Diarrhoeal disease – Fact Sheet*, WHO Media Centre, viewed 31 July 2017, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgileri

Ad-Soyad : Farouk GHALYOUN
Doğum tarihi : 10.10.1988
Doğum yeri : Homs – Suriye
Adres : İstanbul – TÜRKİYE
Cep telefonu : +90 (534) 513 6567
E-Mail : faroukghalyoun@stu.aydin.edu.tr

Eğitim bilgileri

2015 – 2017 Gıda Güvenliği – Yüksek Lisans – İstanbul Aydın Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü – Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı – İstanbul – Türkiye.

2013 – 2014 Beslenme Bilimleri – Lisans (B.Sc.) 3 dönem okumuştur. Justus Liebig Universität Giessen – Giessen – Almanya. 21.08.2014 tarihinde öğrenimden ayrılmıştır.

2006 – 2011 Beslenme ve Gıda Bilimleri – Lisans (B.Sc.) - University of Kalamoon – Deyr-Atiyyah – Suriye. Mezuniyet Yılı: 2011.

2003 – 2006 Lise diploması (Bilimsel bölümü) – Homs – Suriye. Derece: %66.25.

Dil becerileri

İngilizce : Akıcı – (TOEFL PBT)
Almanca : Akıcı – (TestDaF ve DSH-3 belgeleri)
Türkçe : çok iyi (B2 belgesi)
Arapça : Ana dil