T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ÇİĞ VE TÜKETİME HAZIR GIDA ÖRNEKLERİNDE ADENOVİRUSUN MOLEKÜLER TANISI

DENİZ ZEYNEP ERMAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA HASÖKSÜZ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VİROLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Annem Hava KURUM ve babam Oktay KURUM'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın tüm aşamalarında bilgi ve deneyimleri ile desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ'e, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Hüseyin YILMAZ'a, Prof. Dr. Nuri TURAN'a ve Prof. Dr. Aysun YILMAZ'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Utku ÇİZMECİGİL ve Araş. Gör. Dr. Özge AYDIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden Sn. Burçin KESKİN'e hücre kültürü çalışmalarındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca bana destek olan eşim Emrah ERMAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 56661

İÇİNDEKİLER

İTHAF..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
TABLOLAR LİSTESİ..... VII
ŞEKİLLER LİSTESİ..... VIII
SEMBOLLER KISALTMALAR LİSTESİ..... X
ÖZET..... XII
ABSTRACT..... XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 1
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. Gıda Kaynaklı Hastalıklar ve Virusların Önemi..... 3
2.2. Gıda Kaynaklı Başlıca Viruslar..... 5
2.2.1. Norovirus..... 5
2.2.2. Rotavirus..... 6
2.2.3. Hepatit A Virusu..... 7
2.2.4. Hepatit E Virusu..... 7
2.3. Adenoviruslar..... 8
2.3.1. Adenovirusların Tarihçesi..... 8
2.3.2. Etiyoloji..... 8
2.3.3. Adenovirusun Yapısı..... 9
2.3.4. Adenovirusların Sınıflandırılması..... 11
2.3.5. Adenovirus Replikasyonu..... 15
2.3.6. Adenovirus Enfeksiyonlarının Patogenezi ve Klinik Belirtiler..... 17
2.3.7. Adenovirus Epidemiyolojisi..... 18
2.3.7.1. Bulaşma..... 18
2.3.7.2. Dünyada Adenovirusların Gıdalarda Yaygınlığı..... 20

2.3.7.3. Türkiye'de Adenovirusların Gıdalarda Yaygınlığı..... 21
2.3.7.4. Adenovirusların Hayvanlarda Yaygınlığı..... 21
2.3.7.5. Adenovirusların İnsanlarda Yaygınlığı..... 25
2.3.8. Adenovirusların Tanısı..... 29
2.3.9. Adenovirusların Dayanıklılığı ve İnaktivasyonu..... 30
2.3.10. Adenovirus Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol..... 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 33
3.1. GEREÇ..... 33
3.1.1. Gıda Örnekleri..... 33
3.1.2. Moleküler Teşhis Materyalleri..... 35
3.1.2.1. Viral DNA Ekstraksiyon Kiti..... 35
3.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)..... 35
3.1.2.3. Pürifikasyon Kiti..... 36
3.1.2.4. Pozitif Kontroller..... 36
3.1.2.5. Negatif Kontroller..... 38
3.1.2.6. Moleküler Testlerde Kullaılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar..... 38
3.1.3. Virus İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller..... 38
3.1.3.1. Hücre Kültürü..... 38
3.1.3.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Adenovirus İzolatı..... 39
3.1.3.3. Hücre Üretme Vasatı..... 39
3.1.3.4. Phosphate Buffer Saline (PBS)..... 39
3.1.3.5. Tripsin EDTA Çözeltisi..... 39
3.1.3.6. Fötal Bovine Serum (FBS)..... 39
3.1.3.7. Antibiyotik Çözeltisi..... 39
3.1.3.8. L-Glutamine..... 39
3.1.2.9. Virus Üretme Vasatı..... 39
3.2. YÖNTEM..... 39
3.2.1. Gıda Örneklerinin Homojenizasyonu..... 40
3.2.2. Moleküler Teşhis Çalışmaları..... 42

3.2.2.1. Viral Nükleik Asit Ekstaksiyonu..... 42
3.2.2.2. PCR Çalışmaları..... 43
3.2.2.3. DNA Miktarının Saptanması ve PCR Optimizasyonu..... 45
3.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforez..... 45
3.2.2.5. Elde Edilen PCR Ürününün Pürifikasyonu..... 45
3.2.2.6. Sekans İşlemleri..... 46
3.2.3. Virus İzolasyon Çalışmaları..... 46
3.2.3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması..... 46
3.2.3.2. İnokulumun Hazırlanması..... 46
3.2.3.3. HEp-2 Hücre Kültürüne İnokulasyon..... 47
3.2.4. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi..... 48
4. BULGULAR..... 49
4.1. PCR Optimizasyon Bulguları……..... 49
4.2. PCR Sonuçları……..……..... 50
4.2.1. Tüm human adenoviruslarının (HAdV Panadenovirus) saptanmasına yönelik PCR Çalışmalarının Bulguları……..……..…… 50
4.2.2. HAdV 40 ve HAdV 41 İçin Yapılan PCR Çalışmalarının Bulguları…….. 52
4.3.Sekans Sonuçları..... 52
4.4. Hücre Kültürlerinde Virus İzolasyon Sonuçları..... 58
4.5. PCR ile Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi..... 59
5. TARTIŞMA..... 60
KAYNAKLAR..... 69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI..... 84

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı enfeksiyonlardan etkilenen yıllık hasta sayısı, hastaneye yatış sayısı ve ölüm sayısı.....4

Tablo 2 Human Adenovirus gruplarının moleküler ağırlıkları.....12

Tablo 3 Human Adenovirusların hemaglütinasyon özelliklerine göre sınıflandırılması.....13

Tablo 4 *Adenoviridae* familyası içinde bulunan HAdV cinsleri ve türleri.....23

Tablo 5 Hayvanlarda görülen başlıca adenovirus enfeksiyonları.....24

Tablo 6 Human adenovirus grupları, tipleri ve oluşturduğu hastalıklar.....26

Tablo 7 Gıda örneklerinin miktarı ve ürün grupları.....34

Tablo 8 Adenovirus tespiti için kullanılan primerlerin dizilimleri.....36

Tablo 9 PCR çalışmaları için mastermiks içeriği.....43

Tablo 10 Amplifikasyon şartları, sıcaklık ve süreler (HAdV Hex F1&R1).....44

Tablo 11 Amplifikasyon şartları, sıcaklık ve süreler (HAdV 40 & 41 F1&R1).....44

Tablo 12 Gıda örneklerinde adenovirus pozitifliğinin istatistiksel analizi.....59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Virion Morfolojisi.....9

Şekil 2 Adenovirus vironunun elektron mikroskop görüntüsü.....10

Şekil 3 *Adenoviridae* familyası içinde bulunan HAdV türleri ve tipleri.....14

Şekil 4 Adenovirusun replikasyonu.....17

Şekil 5 HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin plazmid haritası.....37

Şekil 6 HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin plazmid dizisi.....38

Şekil 7 Homojenize edilmek üzere hazırlanan midye örneği.....40

Şekil 8 Homojenize edilmiş örnek.....41

Şekil 9 Santrifüj öncesi 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılan örnekler.....41

Şekil 10 Falkon tüplerde saklanan homojenat üst sıvıları.....42

Şekil 11 Altı çukurlu plakalarda HEp-2 hücre kültürüne 10 katlı sulandırılan gıda örneklerinin ekimi……..47

Şekil 12 Dilüe edilen virus süspansiyanlarından elde edilen DNA miktarlarının Nanodrop'taki değerleri.....49

Şekil 13 10 katlı dilüe edilen virus süspansiyonlarından elde edilen DNA miktarlarının PCR görüntüsü……...…49

Şekil 14 26 No.lu midye örneğinin jel elektroforez görüntüsü.....50

Şekil 15 12 ve 14 no.lu şinitzel örneklerinin jel elektroforez görüntüsü.....51

Şekil 16 81 ve 82 no.lu soslu kanat örneklerinin jel elektroforez görüntüsü.....51

Şekil 17 81 ve 82 no.lu soslu kanat örneklerinin HAdV 40 ve HAdV 41 pozitif kontrolleri ile yapılan PCR analizlerinin jel elektroforez görüntüsü.....52

Şekil 18 81 no.lu örneğin HAdV Hekzon geninin F primeri ile elde edilen kromotogram görüntüsü.....53

Şekil 19 81 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu alignment görüntüsü.....54

Şekil 20 82 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu alignment görüntüsü.....55

Şekil 21 81 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu filonegetik haritası.....56

Şekil 22 82 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu filonegetik haritası.....57

Şekil 23 Negatif kontrol HEp-2 hücre kültürü görüntüsü (40X)..…….....58

Şekil 24 HAdV 5 pozitif kontrol HEp-2 hücre kültürü görüntüsü (40X).....58

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	Adenin bazı
AdV	Adenovirus
bp	Baz çifti
C	Sitozin bazı
CAdV	Canine adenovirus
CAR	Coxsackievirus and adenovirus receptor
CD46	Membrane cofactor protein
CDC	Centers for disease dontrol and prevention
CO_2	Karbondioksit
CPE	Cytopathic effects
ddH_2O	Double distilled water
DSG2	Desmoglein 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphat
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EFSA	European food safety authority
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FBS	Fötal Bovine Serum
G	Guanin bazı
GI	Genogrup I
GII	Genogrup II
HACCP	Hazard anaylsis and critical control points
HAdV	Human adenovirus
HEp-2	Human epithelial type 2
ICMFS	International commission on microbiological specifications for foods
ICTV	International committee on taxonomy of viruses
KCl	Potasyum klorür

kDA	Kilodalton
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCBI	National center for biotechnology information
NFκβ	Nuclear Factor kappa B
nm	Nanometre
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Picomoles
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez
T	Timin bazı
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tümör nekrozis faktör
U	Urasil bazı
UV	Ultraviolet

ÖZET

Erman, D. Z. (2022). Çiğ ve Tüketime Hazır Gıda Örneklerinde Adenovirusun Moleküler Tanısı. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Viroloji AbD. Doktora Tezi. İstanbul.

İnsanlarda görülen, salgınlara ve hatta ölümlere neden olan gıda kaynaklı enfeksiyonların patojen etkenleri arasında virusların da bulunduğu hem Türkiye'de hem de dünyada yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu virusların içerisinde en sık rastlanılan etkenler olarak rotavirus, norovirus, hepatitis A virusu, hepatitis E virusu, enterovirus ve adenoviruslar (AdV) karşımıza çıkmaktadır.

Türkiye'de, gıdalarda norovirus, hepatit A virusu ve rotavirus yönünde çok sayıda araştırma mevcuttur. Ancak deniz ürünlerinde human adenovirusların (HAdV) varlığı yönünde araştırmalar oldukça sınırlı olup, kırmızı et ve beyaz et ürünlerinde HAdV varlığına yönelik araştırmaya rastlanılmamıştır.

Adenoviridae familyasında bulunan Mastadenovirus cinsine ait HAdV'ların 68 tipinin neden olduğu hastalıklar arasında akut solunum yolu enfeksiyonu, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, konjonktivit, meningoensefalit ve obezite gösterilebilir. Bu enfeksiyonlar çoğunlukla çocuklarda, yaşlılarda ve ciddi şekilde zayıf bağışıklık sistemine sahip kişilerde görülür.

HAdV tipleri içerisinde HAdV 40 ve HAdV 41'in şiddetli gastroenterit tablosuna neden olması sebebiyle, bu çalışmada çiğ ve tüketime hazır hayvansal gıda örneklerinde HAdV 40 ve HAdV 41 varlığının PCR ile araştırılması ve pozitif bulunan örneklerde virus izolasyonunun yapılması amaçlandı.

Bu çalışmada incelemek üzere, balık pazarlarından, süper marketlerden, kasaplardan ve restoranlardan deniz ürünleri (taze balık, dondurulmuş balık, taze midye, dondurulmuş midye, dondurulmuş kalamar ve ton balığı), beyaz et (göğüs eti, tavuk kanat, dökme piliç, soslu kanat, şinitzel, piliç jambon, piliç sosis ve piliç salam) ve kırmızı et ürünlerinden (kıyma, paketli kıyma, paketli köfte, sucuk, dana salam, dana sosis) oluşan toplam 100 adet örnek toplandı. Örnekler PCR yöntemi ile HAdV 40 ve HAdV 41'in varlığı yönünden incelendi. HAdV tespit edilen örneklerden HEp-2 hücre kültürüne ekim yapıldı. Pozitif bulunan örneklerin tiplendirilmesi için DNA dizilimi ve filogenetik haritalandırma gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, panadenovirus primerleri kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda 2 şinitzel, 2 soslu kanat ve 1 midye örneğinde HAdV tespit edildi. HAdV yönünden pozitif olduğu tespit edilen bu örneklerden, HAdV 40 ve HAdV 41 pozitif kontrolleri kullanılarak yapılan PCR analizlerinde yalnızca 2 soslu kanat örneğinde HAdV 40 ve HAdV 41 varlığı tespit edildi. HAdV 40 ve HAdV 41 yönünden pozitif saptanan 2 soslu kanat örneğinden, 81 no.lu örneğin hekzon gen bölgesinin DNA dizilimi sonucunda F grubunda yer alan HAdV 40 ile yakın benzerlik gösterdiği ancak 82 numaralı soslu kanat örneğinin F grubunda yer alan HAdV 40 ve HAdV 41 ile yakın benzerlik göstermediği tespit edildi. Panadenovirus PCR analizlerinde HAdV varlığı tespit edilen 5 örneğin hücre kültürü çalışmalarında sitopatik etki (CPE) oluşmadığı saptandı.

Özellikle küçük çocuklarda diyareye sebep olan HAdV 40 ve HAdV 41'in kaynağı kesin olarak bilinememekle birlikte, gıda kaynaklı olabileceği göz önüne alındığında, gıda hijyeni konusunda daha ciddi tedbirlere ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Adenovirus, Tip 40, Tip 41, PCR, Gıda örnekleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 56661

ABSTRACT

Erman, D.Z. (2022) Molecular Diagnosis Of Adenovirus In Raw And Ready To Eat Food Samples. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Virology. PhD Thesis, Istanbul.

Pathogens of foodborne infections that cause epidemia and even death in humans include viruses as well as shown in studies both in Turkey and in the world. Among these viruses the most common agents are rotavirus, norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, enterovirus and adenoviruses (AdV).

In Turkey, there are many studies with regard to foodborne norovirus, hepatit A virus and rotavirus. Research on the presence of human adenovirus (HAdV) in seafood is quite limited and no research was found on the presence of HAdV in red meat samples. and poultry meat samples.

Among the diseases caused by 68 types of HAdV which belongs to the genus of Mastadenovirus belonging to the *Adenoviridae* family, there are respiratory tract infections, urinary tract infections, gastrointestinal system infections, conjunctivitis, pneumonia, meningoencephalitis and obesity. Most of these infections occur in children, the elderly and people with a severely weak immune system.

Among the HAdV types, HAdV 40 and HAdV 41 causes severe gastroenteric. Therefore, in our study it was aimed to investigate the presence of HAdV 40 and HAdV 41 in raw and ready-to-eat food samples by PCR and to isolate the virus in positive samples.

In this study, a total of 100 samples consisting of seafood (fresh fish, frozen fish, fresh mussels, frozen mussels, frozen squid and tuna), white meat (breast meat, wings, bulk chicken, sauced wings, schnitzel, chicken ham, chicken sausage and chicken salami) and red meat (minced meat, packed minced meat, packed meat balls, soudjouk, salami, sausage) were collected from fish markets, super markets, bucthers and restaurants. The samples were examined for the presence of HAdV 40 and HAdV 41 by PCR method. HEp-2 cell culture was inoculated with HAdV positive samples. DNA sequencing and phylogenetic mapping were performed for typing of positive samples.

In our study, HAdV was detected in 2 schnitzels, 2 sauced wings and 1 mussel samples as a result of PCR analyzes using panadenovirus primers. Among these samples, which were found to be positive for HAdV, PCR analyzes using HAdV 40 and HAdV 41 positive controls showed the presence of HAdV 40 and HAdV 41 only in 2 sauced wings samples. Of the 2 sauced wing samples those were positive for HAdV 40 and HAdV 41, the hexone gene region of sample no. 81 showed close similarity to HAdV 40 in F group, but the sauced wing sample no. 82 did not show close similarity to HAdV 40 or HAdV 41 in F group. In the cell culture studies of 5 samples, in which the presence of HAdV was detected in Panadenovirus PCR analyzes, cytopathic effect (CPE) was not detected.

Although the exact source of HAdV 40 and HAdV 41 which causes diarrhea in young children is not known, there is a need for food hygiene precautions, considering that it may be foodborne.

Key Words: Adenovirus, Type 40, Type 41, PCR, Food samples

The present work was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpaşa. Project No:56661

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gıda patojenlerinin kontrollerinde özellikle bakteriyel etkenlerin hedeflenmesi, virusların izlenme eksikliği, gıda kaynaklı viral hastalıklar söz konusu olduğunda ülkelerin raporlamayı ihmal etmesi gıda kaynaklı viruslar konusunda daha çok çalışma yapılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Gıdaların soframıza ulaşana kadar geçtiği aşamalarda hijyen koşullarının yetersiz olması insanlarda gastroenterit tablosuna neden olmaktadır. Gastroenterit vakalarında en sık rastlanan etkenler bakteriyel patojenler olsa da viral patojenler de yaygın bir şekilde görülmektedir (Hasöksüz, 2008).

Yapılan çalışmalar viral etkenlerin gıdalara bulaşmasındaki başlıca sebepler arasında kanalizasyon suları ile bulaşık yer altı sularının tarımsal faaliyetlerde kullanılması, pişirmeden tüketilen gıdaların kontamine sularla yıkanması, gıda ürünlerinin işleme, taşıma, ambalajlama, depolama, satın alma, saklama, hazırlama ve pişirme aşamalarında hijyen ve güvenlik kurallarındaki eksikliklere bağlı olarak virusla kontamine çevre veya personellerden bulaşması, midye gibi deniz ürünlerinin kontamine alanlardan toplanması olduğunu göstermektedir (Hasöksüz, 2008)

HAdV her yaş grubundan insanda fakat özellikle 5 yaşından küçük çocuklarda görülen gastroenteritlerin etiyolojisinde önemli viral etkenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (O'Shea ve ark., 2019; Glass ve ark., 1996).

Bugüne kadar 68 HAdV tipi bildirilmiştir (Burrell ve ark., 2017). HAdV sınıflandırılması, serolojik temelli bir sistemden genom dizileme yöntemine geçiş aşamasındadır. Serotipler virion fiberleri ve hekzonları üzerindeki antijenleri içeren hemaglütinasyon ve nötralizasyon testleri ile ayırt edilmiştir. HAdV 1-52 tipleri bu şekilde sınıflandırılmıştır ve serotip olarak adlandırılmıştır. HAdV 52-68 tiplerinin keşfi ve sınıflandırılması ise genom dizileme ve biyoinformatik analizlere dayanmaktadır ve genotip olarak adlandırılmıştır. Bu nedenle her iki grup için kısaca tip ifadesi kullanılmaktadır (Burrell ve ark., 2017; Huang ve Xu, 2013).

Farklı tiplerin, insanlarda oluşturduğu hastalıklar da farklı sistemleri etkilemektedir. Epidemik keratokonjonktivit HAdV 8, HAdV 19 ve HAdV 27 ile ilişkilidir. Bazı HAdV tiplerinde enfeksiyonun şiddeti, bulaşma yolu ve yaygınlığına göre değişmektedir. Örneğin; inhalasyon yoluyla bulaşan HAdV 7 şiddetli alt solunum yolu hastalığıyla ilişkiliyken virusun oral yolla bulaşması durumunda ya hafif şiddetle hastalık oluşur ya da oluşmaz (Pond ve DSÖ, 2005). HAdV 7'nin ayrıca konjonktivite de sebep

olduğu bildirilmiştir (Kitamura, 2001). HAdV 11 sistit ve nefrit gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Pond ve DSÖ, 2005). HAdV 36'nın ise obezite ile bir ilişkisi olduğu tahmin edilmektedir (Powledge, 2004; Hur, 2013; Pond ve DSÖ, 2005)

HAdV 40 ve HAdV 41 çocukluk çağı gastroenteritinin bir nedeni olarak önemi bakımından rotavirusun ardından ikinci sırada yer almaktadır (Crabtree ve ark., 1997; Mickan ve Kok, 1994; Gülen ve Hacımustafaoğlu, 2013). Çocuklarda akut alt solunum yolu enfeksiyonları da dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur (Murray ve Lopez, 1996).

Ülkemizde çocuklardaki gastroenterit vakalarında HAdV 40 ve HAdV 41'e bağlı enfeksiyonlar tespit edilmiştir, ancak hastalık etkeninin kaynağı hakkında sadece hipotezler bulunmaktadır. HAdV'ların gıda yoluyla bulaşabildiği bilinmektedir fakat gastroenterit vakaları içerisinde gıda yoluyla bulaşmanın oranı bilinmemektedir.

Ülkemizde, gıdalarda HAdV 40 ve HAdV 41'in varlığı daha önce bildirilmediği için çalışmamızda çiğ ve tüketime hazır gıda örneklerinde HAdV 40 ve HAdV 41 varlığının PCR ile araştırılması ve pozitif bulunan örneklerde virus izolasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Balık pazarları, süper marketler, kasaplar ve restoranlardan toplanan örneklerin önce HAdV varlığı yönünden, ardından HAdV 40 ve HAdV 41 varlığı yönünden incelenmesini takiben tespit edilen HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin hekzon gen bölgesinin DNA diziliminin yapılması, HAdV pozitif saptanan gıda örneklerinden hazırlanan inokulumların HEp-2 hücre kültürüne inokulasyonu sonucu virusun izolasyonu planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Gıda Kaynaklı Hastalıklar ve Virusların Önemi

1914 yılında bir İngiliz topluluğunda çiğ süt içen 4 çocukta felçli hastalık vakası tespit edildiğinde, bu hastalık "virus ile kontamine gıda tüketimini takip eden hastalık" olarak tanımlanmıştır. Bu hastalığın daha sonra *Picornaviridae* adı verilen bir virus familyasına ait küçük bir virusun neden olduğu çocuk felci olduğu belirtilmiştir. Neredeyse 100 yıl sonra, gıda kaynaklı viral hastalıklar büyük bir sağlık sorunu olarak kabul edilmiş, ancak sorunun boyutu tam olarak tanımlanmamıştır (Myrmel, 2008).

Gıda kaynaklı hastalıklarda etkenler incelendiğinde küçük bir oranın bilinen patojenler olduğu, büyük çoğunluğunda ise patojenin belli olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, gıda kaynaklı hastalıklardan etkilenen toplam hasta sayısının yaklaşık % 59'una, hastaneye yatan hasta sayısının yaklaşık % 27'sine ve ölenlerin % 12'sine viral patojenlerin neden olduğu belirtilmiştir (Scallan ve ark., 2011).

Gıda kaynaklı viruslar insandan insana fekal-oral yolla bulaşabildiği gibi gıdaların da çevresel bulaşmada bir taşıyıcı rol üstlendiği saptanmıştır (Carter, 2005; Tamer 2018). Gıda kaynaklı hastalıklar, küresel hastalık yükünü önemli oranda artırmaktadır. Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların yalnızca hastalık yoluyla değil aynı zamanda popülasyon üzerindeki etkileri azaltmak için alınan önlemlerle ilişkili maliyetler yoluyla da sağlık üzerinde ağır bir yük oluşturduğu bildirilmiştir (Bosch ve ark., 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2013 yılı verilerine göre, gıda kaynaklı hastalıkların tahmini ekonomik yükü yıllık 55,5 milyar dolar olarak belirtilmiştir (Scharff, 2015). Gastroenterit tablosuna sahip vakalar çoğunlukla hafif seyretse de hastaneye yatış ve ölüm vakaları da görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2005 yılında 1.8 milyon kişinin ölümüyle sonuçlanan ishal ile ilişkili hastalıkları kontamine gıda ve içme suyu ile ilişkilendirmiştir (Newell ve ark., 2010).

Yapılan araştırmalar çoğunlukla bakteriyel etkenlere odaklanmakta, bu da olası viral etkenlerin tespit edilememesine neden olmaktadır. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 2011 yılında yayınladığı Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği gıdaların mikrobiyolojik kriterleri ile gıda işletmecilerinin uyması gereken kuralları belirlemeyi amaçlamıştır ancak Gıda Güvenilirliği Kriterleri içerisinde viral etkenler açısından kontrol tanımlanmamıştır (Resmi Gazete, 2011b). Aynı yıl yayınlanan

Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği ise yalnızca canlı çift kabuklu yumuşakçalar için sağlık standartları kapsamında viral etkenlerin test usullerine değinmiştir (Resmi Gazete, 2011a). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) gıda virusları üzerine sunduğu bir raporda hepatit E virusu, hepatit A virusu ve norovirus etkenlerine değinmiş, et ve et ürünlerinde hepatit E virusunun tespitine yönelik standart metodların ve ISO (International Organization for Standardization) metodlarının geliştirilmesi gerektiğine dair öneride bulunmuştur (CEFAS, 2016). Ancak HAdV üzerine bir tavsiye raporuna rastlanmamıştır.

Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC) her yıl ABD'de gıda kaynaklığı hastalıklardan yaklaşık 48 milyon kişinin etkilendiğini, 128.000 kişinin hastaneye yatışının gerçekleştiğini ve 3.000 kişinin de öldüğünü tahmin ettiklerini bildirmiştir (Scallan ve ark., 2011) (Tablo 1).

Tablo 1: ABD'de gıda kaynaklı enfeksiyonlardan etkilenen yıllık hasta sayısı, hastaneye yatış sayısı ve ölüm sayısı (Scallan ve ark., 2011).

Gıda Kaynaklı Etken	Tahmini Yıllık Hastalık Sayısı	Tahmini Yıllık Hastaneye Yatış Sayısı	Tahmini Yıllık Ölüm Sayısı
31 bilinen patojen	9.4 milyon	55.961	1.351
Belirsiz patojen	38.4 milyon	71.878	1.686
Toplam	47.8 milyon	127.839	3.037

Tüm dünyada insanlarda enfeksiyona neden olan gıda kaynaklı başlıca viral etkenler HAdV, rotavirus, hepatit E virusu, norovirus, hepatit A virusu ve astroviruslardır (Banyai ve ark. 2018; Koopmans, 2012). Batı dünyasında bugüne kadar en yüksek hastalık maliyetine sahip olduğu bildirilen viruslar ise norovirus ve rotavirustur (O'Shea ve ark., 2019).

Mikrobiyolojik genomik çalışmalar, norovirus ve hepatit A virusunun öncelikle gıda temaslı kontamine çalışanlardan ve kanalizasyon suyuyla kontamine olmuş gıdalardan bulaştığını göstermiştir. Buna karşılık hepatit E virusunun ise, domuz veya

vahşi hayvanların çiğ veya az pişmiş etlerinin tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Velebit ve ark. 2019).

Myrmel ve ark. (2004) tarafından Norveç'te yapılan bir çalışmada kabuklu deniz ürünü örneklerinin %18.6'sında HAdV, %6.8'inde norovirus, ve %8'inde Circovirus tespit edilmiştir.

HAdV dışında yaygın olarak görülen gıda kaynaklı viruslar aşağıda özetlenmiştir.

2.2. Gıda Kaynaklı Başlıca Viruslar

2.2.1. Norovirus

Caliciviridae familyasına ait olan norovirus insanlarda tipik olarak akut gastroenterit tablosuna neden olur ve en yaygın semptomlar mide bulantısı, kusma, ishal ve mide ağrısıdır. Belirtiler genellikle virusun alımını izleyen 12-48 saat sonra gelişir (Velebit B. ve ark. 2019). Dünyada gastroenterite neden olan gıda kaynaklı viruslar arasında, tüm yaş gruplarında norovirus bir çok ülkede birinci sırayı almaktadır (De Witt ve ark., 2001; Koopmans, 2012; Banyai ve ark., 2018). Jones ve Yackley (2018) ABD'de salgınların epidemiyolojisinin anlaşılması için 1938-2015 yılları arasındaki gıda kaynaklı hastalık salgın verilerini incelemiş ve norovirusun başlıca etken olduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada da norovirus bulaşmasının kontamine kabuklu deniz ürünü ve su tüketimi ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2010).

Sadece ABD'de norovirusun yılda 19-21 milyon hastalık vakasına, 56.000-71.000 hastaneye yatışa ve 570-800 ölüme neden olduğu bildirilmiştir. Norovirus insidansı çocuklarda daha yüksek iken, şiddetli gastroenterit tablosu ve buna bağlı ölümlerin 65 yaşından büyük yetişkinlerde daha yaygın olduğu belirtilmiştir (Banyai ve ark. 2018).

Türkiye'de ise ilk norovirus salgını 2008 yılında Uyar ve ark. (2008) tarafından bildirilmiştir. Önce Aksaray ardından Şereflikoçhisar, Kırşehir ve Adana şehirlerinde ishal ve kusma vakaları görülmeye başlanmış, yapılan ilk incelemelerde sıklıkla görülen bakteriyel ve paraziter etkenlere rastlanmamış ancak yapılan ilave incelemelerde norovirus varlığı tespit edilmiştir. Norovirus RNA tespit edilen vakaların %69,2'sinde Genogrup I (GI) , %30,8'inde ise Genogrup II (GII) tespit edildiği bildirilmiştir.

Yılmaz ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada İstanbul boğazından toplanan 110 midye örneği norovirus GI ve GII yönünden incelenmiş, 5 midye örneğinin

GII yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir. Örnekler arasında GI yönünden pozitifliğe rastlanmamıştır.

2.2.2. Rotavirus

Rotaviruslar *Reoviridae* familyasına ait olan zarfsız, çift iplikli RNA'lı (dsRNA) viruslardır (Greenberg ve Estes, 2009). İnsanlarda rotavirus ile ilişkili hastalıklar çoğunlukla 5 yaşından küçük çocuklarda görülmekte ancak rotaviruslar yetişkinler dahil her yaştaki insanları enfekte edebilmektedir (O'Shea ve ark., 2019; Glass ve ark., 1996). Rotaviruslar diğer enterik etkenlerle karşılaştırıldığında, oluşturduğu gastroenterit tablosu daha şiddetlidir. Rotavirus ve calicivirus, 5 yaşından küçük çocuklarda görülen diyareye bağlı ölümlerin yarısından fazlasından sorumludur (Lanata ve ark., 2013).

Tüm dünyada şiddetli çocuk gastroenteritlerinin başlıca sebeplerinden biri olarak rotaviruslar gösterilmektedir. Çocuklarda 1-3 günlük kısa bir inkübasyon periyodundan sonra hastalık akut ateş ve kusma ile başlar. Ardından kısa süre sonra bol, kanlı olmayan sulu diyare ile seyreder. Orta ile şiddetli tabloda, kusma beslenmeyi engelliyorsa ishal dehidratasyona ve elektrolit anormalliklerine yol açar ve yaşamı tehdit edebilir. Yetişkinlerde ise hastalık asemptomatik veya hafif seyreder. Ancak bu kişiler virusu saçmaya devam ederler (Gastanaduy ve ark., 2013).

ABD'de 2006 yılında aşının uygulanmaya başlamasından önce küçük çocuklarda ve yetişkinlerde şiddetli diyare tablosunun birincil sebebi olarak rotavirusa işaret edilmiştir (CDC, 2021). Burke ve ark. (2018) 2017 yılında yapılan bir çalışmada aşılama sonrası dönemde hastalık insidansının önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir.

Türkiye'de ise farklı yıllarda çeşitli salgınların gerçekleştiği ve rotavirus enfeksiyonlarının daha çok sonbahar ve ilkbahar aylarında görüldüğü bildirilmiştir. 2005 yılında Malatya'da yaşanan bir salgına yönelik yapılan incelemede, 2274 vaka değerlendirilmiş ve rotavirus salgını olduğu tespit edilmiştir. Bunu takip eden incelemelerde ise kuyu suyunun karıştığı kirli şebeke suyunun tüketilmesinin bu salgına sebep olduğu bildirilmiştir (Pehlivan ve ark., 2009). Ülkemizde çocuklardaki birçok rotavirus salgınının kaynağı bildirilmemiştir, fakat Enül (2021) tarafından İstanbul'da yapılan bir çalışmada 105 adet gıda örneği üzerinde RT-PCR yöntemiyle rotavirus varlığı aranmış, örnekler içerisinde 2 adet midyede virusun varlığı tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç taşımadığı belirtilmiştir.

2.2.3. Hepatit A Virusu

Hepatit A virusu *Picornaviridae* familyası içindeki Hepatovirus cinsine aittir (Velebit ve ark., 2019). Virus dışkıyla saçılır ve kontamine gıda ile bulaşır. Hepatit A virusu ayrıca kontamine sudan da bulaşabilir. Yaklaşık 28 günlük bir inkübasyon dönemini takiben enfeksiyon aniden başlar. Bulantı, kusma, koyu renkli idrar, ishal, sarılık, ateş, baş ağrısı, kilo kaybı ve karın ağrısı semptomları görülebilir. Yaşla birlikte semptomların görünürlüğü artar. Altı yaşından küçük çoğu çocukta hastalık asemptomatik seyreder ve diğer insanlar için enfeksiyon kaynağı olabilirler (Matheny ve ark., 2012) ve uzun, hatta ömür boyu sürebilen bir bağışıklığı tetiklerler (Velebit ve ark., 2019).

Türkiye'de Çiftçioğlu ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, ilk kez gıdalarda hepatit A virusu varlığı araştırılmıştır. Çeşitli marketlerden ve balıkçılardan toplanan her biri 100 g olan 15 donmuş midye örneği ile her biri 12-15 adet midye içeren 35 adet taze midye örneği paketi PCR yöntemiyle incelenmiştir. Donmuş midye örneklerinden 2 tanesinde, taze midye örneklerinden ise 3 tanesinde hepatit A virusu tespit edilmiştir. Midyelerin hepatit A virusu için iyi bir fomit (mikrobiyolojik etkenleri taşıyabilen cansız nesne) olabileceği ve çiğ veya yeterince pişirilmeden tüketilmeleri halinde hepatit A virusu enfeksiyonları için bir risk teşkil edebileceği sonucuna varılmıştır. Yılmaz ve arkadaşları (2018) İstanbul boğazından toplanmış olan ve balıkçılardan temin ettikleri midye örneklerinde hepatit A virusu varlığını araştırmış ve örneklerin %3.3'ünün hepatit A virusu yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.4. Hepatit E Virusu

Hepatit E virusu, *Hepeviridae* familyasında Orthohepevirus cinsi içerisinde yer almaktadır. Sanitasyonun yeterli olmadığı gelişmekte olan ülkelerde endemiktir. Hepatit E virusu kontaminasyonu için yüksek riskli yiyecekler arasında enfekte hayvanların çiğ veya az pişmiş etleri yer alır. Hepatit E virusu enfeksiyonu tipik olarak asemptomatik enfeksiyondan akut karaciğer yetmezliğine kadar değişen klinik bir tablo göstermektedir (Harrison ve ark., 2018). Salgınların çoğunun kontamine sulardan kaynaklandığı ve virusun fekal-oral yolla bulaştığı belirtilmektedir (Eker ve ark., 2009).

Eker ve ark. (2009) tarafından Edirne'de yapılan bir çalışmada erişkinlerde hepatit E virusu seroprevalansı araştırılmış, 15 yaşından büyük 582 kişide hepatit E virusu IgC antikorları aranmış ve seroprevalansın % 2.4 olarak saptandığı bildirilmiştir.

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada da yine hepatit E virusu seroprevalansı araştırılmış, bu amaçla 220 sağlıklı kişi ve 41 akut viral hepatit hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde; sağlıklı 220 kişide %7.7, akut viral hepatit hastası 41 kişide ise %19.5 oranında anti-hepatit E virus tespit edildiği bildirilmiştir (Değertekin ve ark., 1995).

2.3.Adenoviruslar

2.3.1. Adenovirusların Tarihçesi

AdV'lar ilk olarak 1953 yılında Rowe ve arkadaşları tarafından (Ye ve ark., 2020) insan adenoid dokudan izole edilmişlerdir (Robinson, 2011). Adenoid doku hücre kültüründe izole edildikleri için familyanın ismi *Adenoviridae* olarak adlandırılmıştır (Mena ve Gerba, 2009).

Trentin ve ark. (1962) HAdV 12'nin bir laboratuvar ortamında hamsterlerde tümörlere neden olabileceğini keşfetmişlerdir. Bu keşiften bu yana HAdV'ların insanlarda kansere sebep olabileceğinden şüphelenilmiş ancak kesin olarak kanıtlanmamıştır.

HAdV içeren deneyler de moleküler biyolojiye önemli katkılar sağlamıştır. En önemlisi, adenoviruslar bilim insanlarının haberci RNA uçbirleşmesini (splicing) anlamalarına yardımcı olmuştur (Price ve ark., 2019).

2.3.2. Adenovirusların Etiyolojisi

İnsanlarda gastroenterit, epidemik keratokonjonktivit, solunum yolları enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları gibi bir çok hastalığın etiyolojisinde HAdV'lar rol oynamaktadır (Crenshaw ve ark., 2019)

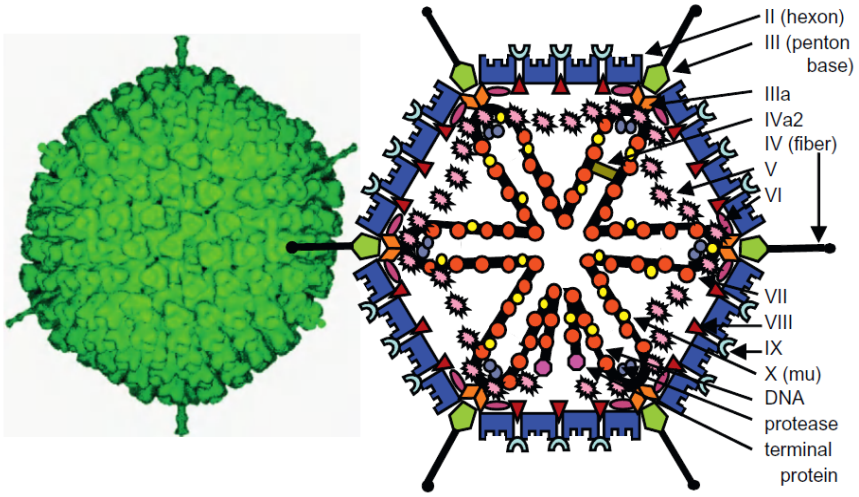
Hayvanlarda ise AdV'un etiyolojide yer aldığı hastalıkların başında köpeklerde enfeksiyöz canine hepatit, atlarda alt ve üst solunum yolu hastalıkları, kümes hayvanlarında egg drop sendromu, hindilerde hemorajik enterit gelmektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2017; Mittal ve ark., 2016; Zakhartchouk ve ark., 2002; Chenier ve ark.,

2019). İlerleyen bölümlerde hem insan hem de hayvanlarda görülen AdV enfeksiyonlarına değinilecektir.

2.3.3. Adenovirusların Yapısı

AdV'lar zarfsız, hekzagonal yapıda ve ikosahedral simetriye sahip olup 70-90 nm çapındadır (Harrach ve ark., 2012). Çift iplikçikli DNA'ya sahiptir ve 26.000-46.000 bp büyüklüğündedir (Ghebremedhin, 2014).

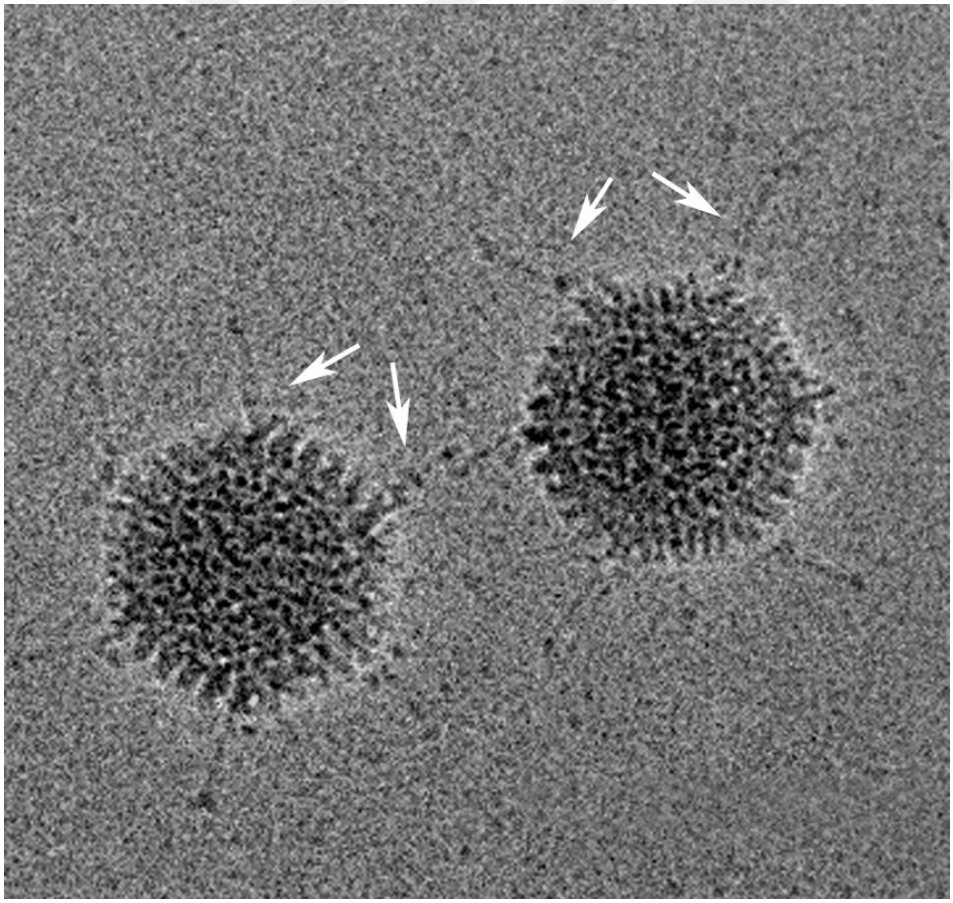
İkosahedral kapsid, 8-10 nm çapındaki 240 non-vertex kapsomerden (hekzon) ve her biri virion yüzeyinde çıkıntı veren fiber 12 vertex kapsomerden (penton bazı) oluşur ve bu da viriona Şekil 1'de görülen diyagramize ve Şekil 2'de görülen elektron mikroskobik morfolojisini verir.



Şekil 1: Virion morfolojisi (Harrach ve ark., 2012)

Penton bazı ve fiber, birlikte pentonu oluşturmaktadır. Şimdiye kadar incelenen liflerin uzunluğu 9 ile 77,5 nm arasında değişmektedir. HAdV 40 ve 41, verteksler üzerinde dönüşümlü olarak meydana gelen iki farklı uzunlukta life sahiptir. Aviadenovirus cinsine ait AdV'lar her bir verteks için 2 fiber proteinine sahiptir. Hekzon üç özdeş polipeptitin (II olarak belirtilmiş) etkileşimi ile şekillenir ve iki ayrı bölümden oluşur. Bunlar; üç "kule"li üçgen bir tepe ve merkezi kaviteli bir psödoheksagonal tabandır. Hekzon bazları sıkıca paketlenmiştir ve iç bileşenleri koruyan bir protein kabuğu oluşturur. Mastadenovirus cinsinin üyelerinde, her bir yüzün merkezindeki 9 hekzon arasında 12 adet polipeptit IX kopyası bulunur. Polipeptit IX diğer dört cinste

bulunmaz, IIIa'nın iki monomeri verteks bölgesinin altında yer almaktadır. Protein VI'nın birden fazla kopyası peripentonal hekzonların altında bir halka oluşturur. Oniki penton bazının her biri, beş polipeptitin (III) etkileşimi ile oluşturulur ve her biri; distal topuza sahip karakteristik uzunlukta bir şaft oluşturmak üzere etkileşime giren 3 polipeptitten (IV) oluşan bir veya iki (yalnızca aviadenoviruslarda) fiber ile sıkıca birleştirilir. Oniki penton (III ve IV), komşu (peripentonal) hekzonlarla daha az sıkı ilişkilidir. Polipeptit VIII, hekzon kapsidin iç yüzeyine tahsis edilmiştir. Diğer polipeptitler (IIIa monomerleri, IX trimerler ve VI multimerleri) hekzonlarla temas halindedir ve sürekli protein kabuğunu tamamlarlar. Polipeptitler VI ve VIII'in, kapsidi virus çekirdeğine bağladığı düşünülmektedir. Çekirdek, dört polipeptitle (V, VII, X, mu veya μ olarak da bilinir ve terminal protein) kompleks oluşturulmuş DNA genomundan oluşur. Protein V sadece mastadenoviruslarda bulunur (ICTV, 2011).



Şekil 2: HAdV 5'in elektron mikroskop görüntüsü (Goosney ve Nemerow, 2003)

2.3.4. Adenovirusların Sınıflandırılması

Adenoviridae familyasına ait olan AdV'lar cins, tür ve tiplere ayrılarak sınıflandırılır. Familyada altı cins mevcuttur: Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus, Ichtadenovirus ve Testadenovirus (MacLachlan ve Dubovi, 2017; ICTV, 2020).

Mastadenovirus: Kuş, yarasa, köpek, ruminant, at, insan, maymun, deniz aslanı, kokarca, sincap, kutup ayısı, yunus, domuz ve fareleri de içeren sadece memelileri enfekte eden AdV'lardır (Harrach ve ark., 2012; MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Aviadenovirus: Ördek, kuşlar, hindi ve kazları enfekte eden AdV'lardır (Harrach ve ark., 2012).

Atadenovirus: Büyükbaş, küçükbaş, kertenkele, ördek, Avustralya keçeli sıçanı, psitakin ve yılanları enfekte eden AdV'lardır (Harrach ve ark., 2012).

Siadenovirus: Kuş, sürüngen ve amfibik türleri enfekte eden AdV'lardır (MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Ichtadenovirus: Mersin balıklarını enfekte eden AdV'lardır (Harrach ve ark., 2012).

Testadenovirus: Yarı sucul kaplumbağaları enfekte eden AdV'ları içermektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2017; ICTV, 2020)

Adenoviridae familyası içinde yer alan 6 cinsten biri olan Mastadenovirus cinsi içerisinde 51 tür bulunmaktadır. Bu 51 türden 7 tanesi Human Adenoviruslardır : Human Mastadenovirus A, Human Mastadenovirus B, Human Mastadenovirus C, Human Mastadenovirus D, Human Mastadenovirus E, Human Mastadenovirus F, Human Mastadenovirus G (ICTV, 2020). HAdV'ları yedi gruba (HAdV A-G) ayırmak için biyolojik özellikler, çapraz nötralizasyon eksikliği, sekans ilişkisi, patoloji ve diğer özellikler kullanılmıştır. Bu 7 tür ise toplam 68 tip içermektedir. HAdV tiplerinin sınıflandırılması ise serolojik temelli bir sistemden genom dizileme yöntemine geçiş aşamasındadır. Serotipler virion fiberleri ve hekzonları üzerindeki antijenleri içeren hemaglütinasyon ve nötralizasyon testleri ile ayırt edilmiştir. HAdV 1-52 tipleri bu şekilde sınıflandırılmıştır ve bu nedenle serotip olarak adlandırılmıştır. HAdV 52-68 tiplerinin keşfi ve sınıflandırılması ise genom dizileme ve biyoinformatik analizlere dayanmaktadır, bu nedenle genotip olarak adlandırılmıştır. Günümüzde serotip ve

genotip ifadelerinin yerine kısaca tip ifadesi kullanılmaktadır ve sınıflandırma DNA sekansına dayandırılmakta olup ana kapsid proteini olan hekzonun nükleik asit sekansına göre tipler tanımlanmaktadır (Berk 2013; Burrell ve ark., 2017; Huang ve Xu., 2013; ICTV, 2020).

Göran (1979) tarafından yapılan bir çalışmada, HAdV sınıflandırılması poliakrilamit jel elektroforez yöntemiyle yapılmıştır. Çalışmada B ve C grubundaki tiplerin tamamı ile A ve D grubundan seçilen tipler dahil toplam 15 HAdV tipi SDS-PAGE yöntemiyle virion polipeptit kompozisyonu açısından incelenmiştir. Aynı gruba ait HAdV tiplerinin yapısal polipeptitlerinin belirgin bir moleküler ağırlık kalıbını paylaştığı gösterilmiştir (Tablo 2). Yapısal polipeptitler, HAdV'ların gen ürünlerinin büyük kısmını oluşturmaktadır. Bu sebeple, viral polipeptitlerin moleküler ağırlıklarındaki belirgin farklılığın, HAdV tipinin identifikasyonunun doğrulanmasında ve HAdV gruplarının sınıflandırılmasında kullanılması önerilmiştir (Wadell G., 1979).

Ayrıca, National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da HAdV için 100'ün üzerinde tip bildirilmekte ancak tip 68'den sonrası ICTV'de henüz doğrulanmamıştır.

Tablo 2: HAdV gruplarının moleküler ağırlıkları (Göran, 1979)

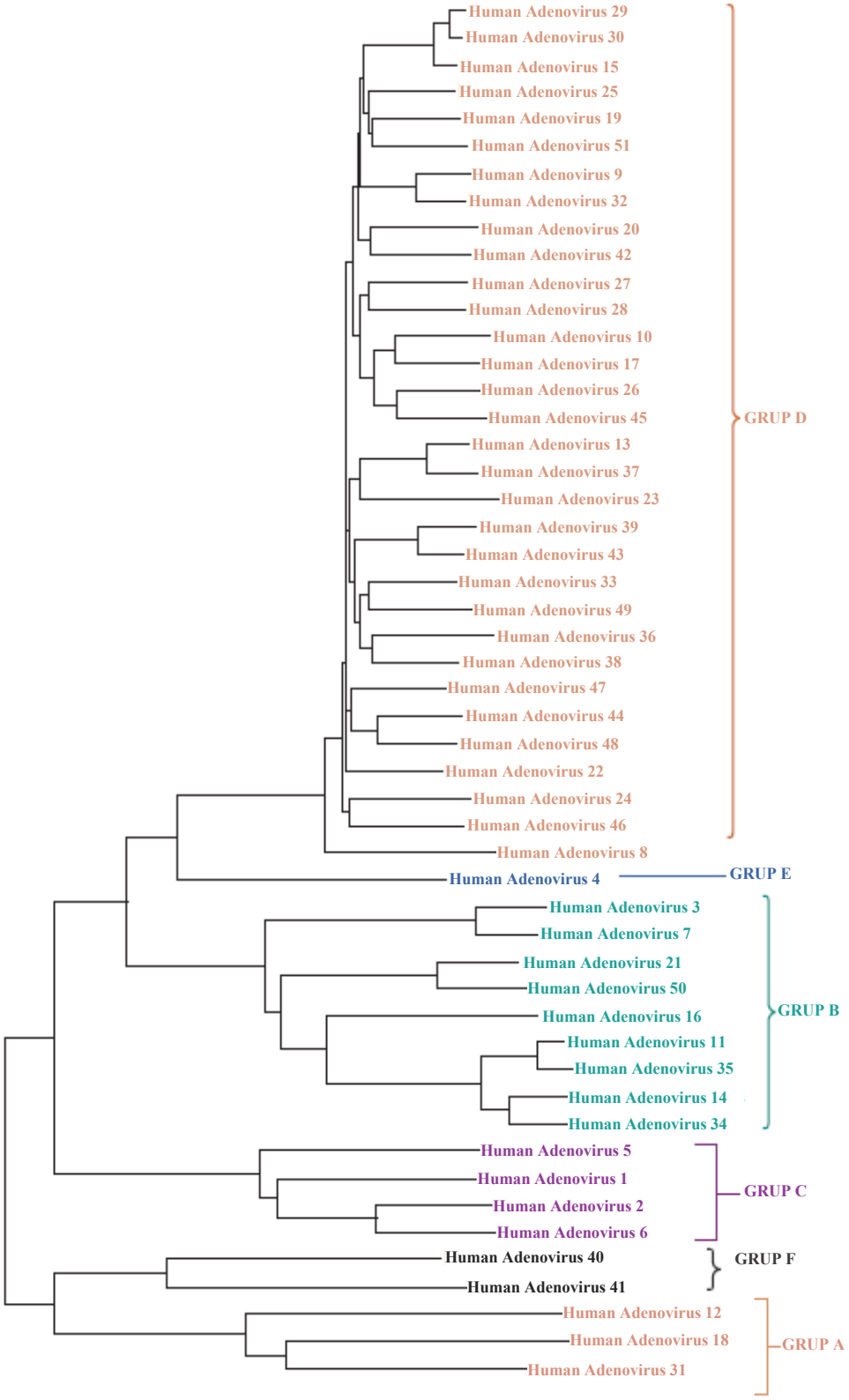
A grubu	V: 46-48.5 K ve 51-51.5 K	VI: 25.5 K	VII: 18 K
B grubu	V: 53.5-54.5 K	VI: 24 K	VII: 18 K
C grubu	V: 48.5 K	VI: 24 K	VII: 18.5 K
D grubu	V: 50.5 K	VI: 23.5 K	VII: 18 K

HAdV tipleri farklı canlı türlerinin eritrositleriyle verdiği hemaglütinasyon özelliğine göre gruplandırılmıştır (Tablo 3). Her bir HAdV tipi bilinen diğer HAdV tiplerine karşı antiserumlar tarafından nötralizasyonuna karşı direnci ile ayırt edilmektedir ve bu şekilde hemaglütünasyon özelliklerine göre de gruplandırılmışlardır (Mena ve Gerba, 2009).

Tablo 3: HAdV'ların hemaglütinasyon özelliklerine göre sınıflandırılması (Berk, 2013).

Grup	**Tip**	**Hemaglütünasyon Grubu**
A	12, 18, 31	IV (aglütünasyon az veya hiç yok)
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	I (Rhesus maymunu eritrositlerinde tam aglütünasyon)
C	1, 2, 5, 6	III (Sıçan eritrositlerinde kısmi aglütünasyon)
D	8,9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51	II (Sıçan eritrositlerinde tam aglütünasyon)
E	4	III
F	40, 41	III
G	52	Bilinmiyor

Günümüzde kullanılan filogenetik haritaya bakıldığı zaman, HAdV'ların tür ve tiplerine göre Şekil 3'teki gibi sınıflandırıldığı görülmektedir.



Şekil 3: *Adenoviridae* familyası içinde bulunan HAdV türleri ve tipleri (Kang ve Giri, 2020)

2.3.5. Adenovirusların Replikasyonu

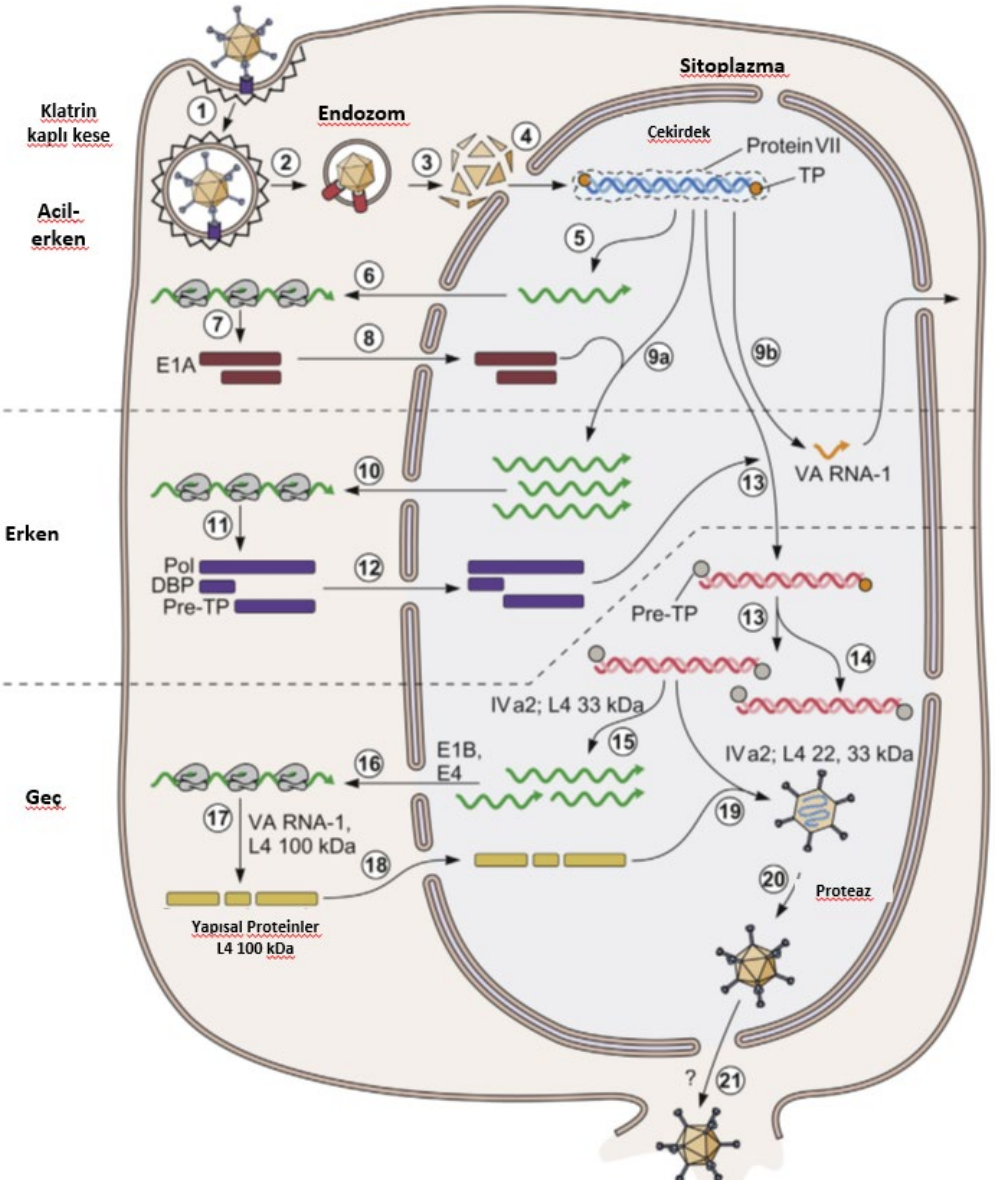
AdV'ların replikasyonu hücrenin çekirdeğinde gerçekleşir ve konakçının immun yanıtının düzenlenmesi ile replikasyon kolaylaşır. Virus, penton fiberi aracılığıyla konak hücre reseptörlerine bağlanır ardından hücresel integrinler ve penton bazı arasındaki etkileşim aracılığıyla hücre içine giriş başlar. Kapsid çıkarılır ve viral genomun bulunduğu kısım ilgili histonları ile birlikte mesajcı RNA (mRNA) transkripsiyonunun, viral DNA replikasyonunun ve virionların birleşmesinin gerçekleştiği çekirdeğe girer.

Genom, çekirdekte her iki DNA zincirini de içeren karmaşık bir programa göre hücresel RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Beş erken (E) transktripsiyonel birim (E1A, E1B, E2, E3 ve E4), iki orta ünite (IX ve Iva2) ve geç mRNA'ların (L1-L5) kopyalandığı bir geç (L) ünite bulunmaktadır (MacLachlan ve Dubovi, 2017; Crenshaw ve ark., 2019). Her bir erken bölge ayrı promotorun kontrolü altındayken, geç bölge ana geç promotor olarak adlandırılan tek bir promotor kullanmaktadır. Viral genomun E1A bölgesi proteinleri kodlar ve bu proteinler erken AdV transkripsiyonunda elde edilmek istenen başlıca üç sonuç için gereklidir: 1- virusun replikasyonu için gerekli olan optimum koşulları sağlamak amacıyla hücre döngüsünün uyarılması, 2- enfekte hücrelerin konakçının antiviral immun savunmasından korunması (sitokin kaynaklı apoptoz dahil), 3- viral DNA replikasyonu için gerekli olan viral proteinlerin sentezi.

E1A ve E1B proteinleri ayrıca hücre transformasyonundan ve dolayısıyla bazı AdV'ların onkojenizitesinden (deneysel) sorumludur. Her iki protein de p53 olarak adlandırılan hücresel tümör süpresör genini inaktive eder ve böylece hücre döngüsünün devamlılığını sağlar. İnaktivasyona p53'ün übikitinasyonu ve diğer proteinlerin virusla birleştirilmiş E3 ligazları yoluyla proteazom aracılı bozulmaya yol açması vasıtasıyla düzenlenir. E3 bölgesi hücre kültürlerinde AdV replikasyonu için gerekli değildir ve in vitro koşullarda virus replikasyonunu bozmadan silinebilir veya değiştirilebilir. Bu nedenle de AdV vektörleri oluşturulurken yabancı DNA için yerleşme bölgelerinden biridir. E3 proteinlerinin konakçı immun savunma mekanizması ile etkileşimde olduğu bilinmektedir ve böylece AdV enfeksiyonlarına karşı konakçının yanıtını düzenlemektedir. E3/19K tarafından sınıf I ana doku uyumluluğunun inhibisyonu, enfekte hücrelerin sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından tanınmasını da inhibe etmektedir. Tümör nekrozis faktör (TNF) tarafından uyarılan apoptozis adenoviral E3/14.7K'nın, TNF reseptör 1'in içeri alımını engellemesi

vasıtasıyla inhibe edilir. E3/14.7K'nın aynı zamanda çekirdek faktör NFκβ transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek antiviral inflamatuar yanıtı düzenlediği de gösterilmiştir.

Primer olarak 5'-bağlı 55K proteini kullanan viral DNA replikasyonu, bir dizi değiştirme mekanizması ile her iki uçtan ilerler. Tekrarlayan sekanslar, replikasyonun başlangıç noktası işlevine göre sap benzeri yapılar oluşturur. DNA replikasyonundan sonra geç mRNA'lar transkripte edilir ve bunlar yapısal proteinlere dönüştürülür. AdV'ların tüm geç kodlama yapan bölgeleri ortak bir promotor olan ana geç promotor tarafından transkripte edilir. Başlangıç transkripti yaklaşık 29 kb büyüklüğündedir. Konak hücrenin makro-moleküler sentezinin durdurulması replikasyon döngüsünün ikinci yarısında gerçekleşir. Virionlar çekirdekte birleşir ve burada kristal diziler oluştururlar. Birçok AdV konakçı hücre kromatininin şiddetli bir şekilde yoğunlaşmasına ve marjinasyonuna neden olarak çekirdeklerin anormal görünmesine sebep olur. AdV ile enfekte olmuş hücrelerde karakteristik olarak görülen inklüzyon cisimlerinin temeli de budur. Virionlar hücrenin lizisi ile serbest kalır (MacLachlan ve Dubovi, 2017).



Şekil 4: AdV replikasyonu (MacLachlan ve Dubovi, 2017)

2.3.6. AdV Enfeksiyonlarının Patogenezi ve Klinik Belirtiler

AdV'lar bir çok canlı türünde yaygın olup, çeşitli organlarda asemptomatikten ölümle sonuçlanabilen şiddette enfeksiyonlara neden olurlar. Patojeneziteyi belirleyen faktörler arasında AdV'un spesifik hücresel reseptörlere bağlanması, subviral partiküllerin oluşması, özellikle koagülasyon faktör C gibi kandaki proteinlerle etkileşime girmesi, E1A, E1B, E3 ve E4 erken gen bölgelerinin özellikleri sayılmaktadır. Ayrıca, enfeksiyonun şiddetinin AdV'ların bazı tiplerine karşı spesifik antikorların varlığı veya yokluğu, kronik hastalıklar ve immun sistemin baskılanmış olması da hastalığın şiddetine

etki etmektedir (Ageeva ve Yatsyshina, 2019; Benevento ve ark., 2014). Fakat bir çalışmada immun yetmezliği bulunmayan kişilerde de HAdV'nin enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir (Lion, 2014).

AdV'lar birçok canlı türünde yaygındır ve sağlıklı bireylerin lenfoid dokularında yaşam boyu kolaylıkla izole edilebilirler. AdV'lar başlangıçta farinks, konjonktiva veya ince bağırsakta çoğalırlar ve genellikle servikal, preauriküler veya mezenterik lenf düğümlerinin ötesine yayılmazlar. Enfeksiyon genellikle lokalize kalır. Çoğu enterik enfeksiyon ve bazı solunum yolu enfeksiyonları subkliniktir. Sistemik enfeksiyonlar özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda ve ayrıca transplantasyon geçiren kişilerde nadiren görülebilir. Ölümler özellikle en ölümcül tip olan HAdV 7'den kaynaklı meydana gelmektedir. Otopside akciğerler, beyin, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda karakteristik bazofilik nükleer inklüzyonlar görülür. Hücrenin lizisi sırasında enfekte hücrelerden yüksek miktarda viral penton lif proteininin salınması virusun yayılmasını artırabilecek olası bir mekanizmadır. Fiber protein epitelyal bağlantı proteini olan desmoglein 2'ye (DSG2) bağlanır, böylece hücre içi sinyalleşmeyi ve epitel hücreleri arasındaki bağlantıların geçici olarak açılmasını tetikler. Bu, epitel dokularında virusun yanal yayılmasını kolaylaştırabilir (Burrell ve ark., 2017; Ageeva ve Yatsyshina, 2019).).

2.3.7. Adenovirusların Epidemiyolojisi

2.3.7.1. Bulaşma

HAdV'lar oldukça bulaşıcıdır ve okullar veya askeriye gibi kalabalık topluluklarda lokal salgınlara sebep olmaktadır (CDC, 2019; Guo ve ark., 2020).

Solunum yoluyla bulaşma: Genellikle öksürük veya hapşırma yoluyla saçılan HAdV'lar aerosol haline getirilmiş viral partiküller veya mukus damlacıkları yoluyla gözlerin veya solunum yolunun mukozalarını enfekte edebilir (Usman ve Suarez, 2022; Rajaiya ve ark., 2021).

Doğrudan temas: Kontamine yüzeyler HAdV'un kuru ortamlara karşı dirençli olması sebebiyle bulaşmada önemli bir rol oynayabilir (Gerba, 2015). HAdV'lar ayrıca kimyasallara ve pH etkilerine dayanabilir. Bu nedenle virus kontamine bir yüzeye dokunmanın ardından mukoza, gözler veya ağız yoluyla bulaşabilir.

Fekal-Oral: Bu bulaşma genellikle kontamine yiyecek veya su yoluyla ya da yetersiz kişisel hijyen nedeniyle gerçekleşir (Hasöksüz, 2008). Gıda üretiminin ilk

aşamasında kontamine su ile yıkanmış meyve ve sebzelerin kontamine olması, gıda üretiminin ileri aşamalarında ise kontamine personelin gıdayı, özellikle tüketime hazır sunulan gıdaları kontamine etmesi sebebiyle viruslar insanlara bulaşabilmektedir (O'Shea ve ark., 2019). HAdV enfeksiyonlarının bulaşması tipik olarak akut enfeksiyonu olan veya enfeksiyon sonrası asemptomatik olup viral saçılımı olan kişilerden solunum damlacıkları veya feka-oral yolla gerçekleşir. Enterik HAdV fekal-oral yolla bulaşmakta, ayrıca respiratorik HAdVlar dahil tüm HAdV tipleri dışkı örneklerinde tespit edilebilmektedir (Afrad ve ark., 2018; Kumthip ve ark., 2019; Lee ve ark., 2020). Çocuklarda HAdV enfeksiyonlarında saçılmanın 3 ay kadar sürebildiği belirtilmektedir (Ye ve ark., 2017). Virus aynı zamanda kontamine fomitler yoluyla da bulaşabilmektedir. Bir çalışmada, keratokonjonktivite neden olan HAdV 19'un plastik yüzeylerde 35 güne kadar canlı kaldığı gösterilmiştir (Nauheim ve ark., 1990). Enfekte personelin virusu kusma yoluyla da saçtığı bildirilmiştir. Enfekte personelin kusmuk örneğinde elektron mikroskopuyla virus partikülleri tespit edilmiş ve bunun enfeksiyonun önemli kaynaklarından biri olduğu belirtilmiştir (Caul, 1994). Fışkırır tarzda bir kusmanın sonucunda virusu içeren aerosollerin gıdanın işlendiği yerlerde geniş bir alana yayıldığı ve sonucunda gıdanın kontamine olduğu belirtilmiştir (Seymour ve Appleton, 2001).

Su kaynaklı: HAdV'lar yüzme havuzlarında özellikle yetersiz klor kullanıldığında bulaşabilmektedir (Papapetropoulou ve Vantarakis, 1998). Avrupa'da 6 ülkede yapılan bir çalışmada ırmak, göl, deniz ve rezervuarlardan alınan su örneklerinde enterik viruslar aranmış ve HAdV 41 ile Mammalian Orthoreovirus içerdikleri tespit edilmiştir (D'Ugo ve ark., 2016). Yapılan bazı çalışmalar içme sularıyla da bulaşmanın gerçekleştiğini göstermiştir. Avrupa'da içme suyu kaynaklı 3 gastroenterik HAdV salgını bildirilmiştir (Divizia ve ark., 2004; Kukkula ve ark. 1997; Villena ve ark. 2003). Güney Kore'de yapılan bir çalışmada ise toplanan 29 yeraltı suyu örneğinin %17'sinde enterik viruslara rastlandığı, bu virusların içerisinde en çok görülenin ise HAdV olduğu bildirilmiştir (Cheong ve ark., 2009).

Diğer bulaşma yolları: Yenidoğanlarda servikal sekresyon yoluyla nadir bulaşma vakaları da belgelenmiştir (Rhee ve Barouch, 2015). Keratokonjonktivite neden olan tiplerin oftalmik aletler ve göz damlaları yoluyla bulaştığı vakalar da bildirilmiştir (Lynch ve Kajon, 2016). HAdV 19 ve HAdV 37'nin ise cinsel yolla da bulaştığı, ülseratif genital lezyonlar, servisit ve üretritle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Heim ve ark., 2003).

Cinsel yolla bulaşabilen diğer tipler arasında HAdV 2 ve HAdV 8 de gösterilmiştir (Swenson ve ark., 1995).

2.3.7.2. Dünyada Adenovirusların Gıdalarda Yaygınlığı

Finlandiya'da 1, Arnavutluk'da 2 içme suyu kaynaklı gastroenterit salgınına HAdV'ların da dahil olduğu bildirilmiştir (Divizia ve ark., 2004; Kukkula ve ark. 1997; Villena ve ark. 2003). Avrupa'da yapılan bir başka çalışmada İtalya, Fransa, Almanya, İrlanda, Bulgaristan ve Türkiye'deki ırmak, göl, deniz ve rezervuarlardan alınan su örneklerinde enterik viruslar aranmış ve HAdV 41 ile Mammalian Orthoreovirus içerdikleri tespit edilmiştir. Yalnızca 1 örnekte hiç bir enterik virusa rastlanmamıştır (D'Ugo ve ark., 2016).

Cheong ve ark. (2009) tarafından Güney Kore'de yapılan bir çalışmada sebzelerde enterik virusların varlığı aranmış ve bu amaçla çeşitli çiftliklerden 30 adet sebze örneği, 29 adet de yeraltı suyu örneği toplanmıştır. Yer altı sularının %17'sinde ve sebze örneklerinin ise %10'unda enterik viruslara rastlandığı, bu virusların içerisinde en çok görülenin ise HAdV olduğu bildirilmiştir.

Norveç'te yapılan bir çalışmada, Norveç kıyılarında konumlanan ticari üretim tesislerinden ve hasat bölgelerinden, 2000 yılı Haziran ayı ile 2003 yılı Haziran ayı arasında 2-4 hafta aralıklara toplanan toplam 696 adet midye örneği (her bir örnek 10-25 adet midye veya 5 adet istiridye içermektedir) enterik viruslar açısından analiz edilmiştir. Toplam 696 örnekten sadece 86 tanesi HAdV açısından incelenmiş, 16 tanesinin (%18.6) HAdV pozitif olduğu tespit edilmiştir. Pozitif bulunan örneklerden 2 tanesinin yaz aylarında, 14 tanesinin ise kış aylarında toplandığı bildirilmiştir (Myrmel ve ark., 2004). İspanya, Yunanistan ve Finlandiya'yı kapsayan bir çalışmada, Mayıs-Aralık ayları arasında perakende satış noktalarından toplanan midye örneklerinde norovirus genogrup I ve II, hepatit A virusu, hepatit E virusu ve HAdV aranmış ve %36 oranla en çok görülen virus HAdV olarak bildirilmiştir (Diez Valcarce ve ark., 2012). Hindistan'da Eylül 2017-Mayıs 2018 tarihleri arasında farklı balık pazarlarından, marketlerden, balık toplama tesislerinden ve çamurluk alanlardan toplanan balık ve kabuklu deniz ürünlerinde enterik HAdV aranmış ve 47 örnekten 10 tanesinde (%21.3) HAdV tespit edilmiştir. Lokasyona dayalı analiz edildiğinde 10 örnekten 5 tanesinin balık pazarlarından, 1 tanesinin marketten, 2 tanesinin balık toplama tesislerinden, 2 tanesinin ise çamurluk alanlardan toplanmış olduğu bildirilmştir (Ghosh ve ark., 2019).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, Sicilya'dan toplanan taze ve dondurulmuş kabuklu deniz ürünleri, sebze ve su örneklerini içeren geniş çeşitliliğe sahip numunelerde enterik viruslar aranmış ve bu amaçla 108 adet taze ve dondurulmuş kabuklu deniz ürünü, 51 sebze, 18 meyve, 23 adet çevre suyu, 11 adet gastronomik preparat ve 28 yüzey svabı toplanmıştır. Toplanan örneklerden yalnızca kabuklu deniz ürünlerinde %1.9 oranında HAdV pozitifliği tespit edilmiştir (Purpari ve ark., 2019).

2.3.7.3. Türkiye'de Adenovirusların Gıdalarda Yaygınlığı

Ghalyaun ve Alçay (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, İstanbul'un farklı bölgelerinden toplanan midye ve karides örnekleri HAdV, astrovirus ve rotavirus yönünden incelenmiş, karides örneklerinin hiç birinde incelenen viruslara rastlanmadığı bildirilmiştir. Ancak toplanan 1350 adet midye örneğinin %46.15'inin HAdV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız literatür incelemelerine göre ülkemizde beyaz ve kırmızı et ürünlerinde HAdV varlığına yönelik bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Mevcut diğer araştırmaların deniz ürünlerinde HAdV tanısına yönelik olduğu görülmüştür.

Bu çalışmamız deniz ürünleri dışındaki hayvansal gıda örneklerinde HAdV 40 ve HAdV 41'in tanısına yönelik yapılan ilk çalışmadır.

2.3.7.4. Adenovirusların Hayvanlarda Yaygınlığı

Adenoviridae familyası içerisinde yer alan 6 adenovirus cinsi ve bu cinsler içerisinde yer alan çok sayıda AdV türü Tablo 4'de sınıflandırılmış şekilde görülmektedir (ICTV, 2020). AdV türleri ve hayvanlarda oluşturduğu hastalıklar da Tablo 5'de yer almaktadır.

Hayvanlarda hastalık oluşturan AdV'lardan en bilineni Mastadenovirus cinsi içerisinde yer alan Canine Adenovirus 1 (CAdV 1) ve Canine Adenovirus 2 (CAdV 2)'dir. CAdV 1, köpeklerde enfeksiyöz hepatite neden olmakla birlikte konjonktivit, peteşiyel hemoroji ve korneada ödem belirtilerine de yol açabilmektedir (Bulut ve ark., 2013; Sykes, 2014; Sarac ve ark., 2021). CAdV 1'in aksine CAdV 2'nin solunum yolunda lokalize olarak enfeksiyöz solunum hastalığına neden olduğu bilinmektedir. CAdV 1'e karşı hem canlı hem de inaktif aşılar yıllardır kullanılmaktadır ancak aşı virusunun sistemik replikasyonu korneada ödeme sebep olmaktadır. CAdV 2 aşıları ise korneada

ödeme sebep olmadığı gibi CAdV 1 enfeksiyonlarına karşı çapraz koruma sağlamaktadır (MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Gıda amacıyla yetiştirilen hayvanlarda AdV'ların önemi değişkendir. Bovine AdV'ların bazı tipleri, pnömoni, enterit, konjonktivit, keratokonjonktivit ve zayıf buzağı sendromu görülen buzağılardan izole edilmiştir. Kuzulardan izole edilen adenoviruslar ise çoğunlukla solunum sistemi hastalıklarına ve enterik hastalıklara sebep olmaktadır. Besi hayvanlarında AdV'ların sınıflandırılması karmaşıktır. Bovine AdV 1, 3 ve 10 Mastadenovirus cinsi içerisinde yer alıp bovine mastadenovirus A, B ve C türleri arasındayken, bovine AdV 4, 5 ve 8 ise atadenovirus cinsi içerisinde bovine atadenovirus D türünde yer almaktadır (MacLachlan ve Dubovi, 2017).

Kanatlılarda AdV'ların sebep olduğu önemli hastalıklar arasında, atadenovirus cinsi içerisinde yer alan Duck atadenovirus A'nın sebep olduğu Egg Drop Sendromu yer almaktadır. Ördek ve kazların virusun doğal konakçısı olduğu düşünülmektedir. Sendrom yumuşak kabuklu yumurta veya kabuksuz yumurta ile kendisini gösterirken tavuklar genellikle sağlıklı kalmaktadır. (Roberts ve ark., 2011). Virus, doğrudan tavuğun sağlığı üzerinde bir etki göstermediği halde yumurta veriminde azalma ve yumurta kalitesi üzerinde olumsuz etki oluşturması sebebiyle ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Tablo 4: *Adenoviridae* familyasında bulunan AdV'ların cinsleri ve türleri ile antijenik grupları (ICTV, 2020)

Atadenovirus	**Aviadenovirus**	**Mastadenovirus**	**Siadenovirus**	**Ichtadenovirus**	**Testadenovirus**
Sığır (Grup D, E)	Atmaca aviadenovirus (Grup A)	Sığır mastadenovirus (Grup A, B, C)	Kurbağa siadenovirus (Grup A)	Mersin balığı ichtadenovirus (Grup A)	Yarı sucul kaplumbağa testadenovirus (Grup A)
Geyik (Grup A)	Kümes hayvanı aviadenovirus (Grup A, B, C, D, E)	Köpek mastadenovirus (Grup A)	Yırtıcı kuş siadenovirus (Grup A)		
Ördek (Grup A)	Kaz aviadenovirus (Grup A)	At mastadenovirus (Grup A, B)	Hindi siadenovirus (Grup A)		
Koyun (Grup D)	Ördek aviadenovirus (Grup B)	Fare mastadenovirus (Grup A, B, C)	Büyük baştankara siadenovirus (Grup A)		
Keçeli sıçan (Grup A)	Güvercin aviadenovirus (Grup A, B)	Koyun mastadenovirus (Grup A, B, C)	Penguen siadenovirus (Grup A)		
Yılan (Grup A)	Psitakin aviadenovirus (Grup B, C)	Domuz mastadenovirus (Grup A, B, C)	Psitakin siadenovirus (Grup D, E)		
Kertenkele (Grup A, B)	Hindi aviadenovirus (Grup B, C, D)	Maymun mastadenovirus (Grup A, B, C, D, E, F, G, H)	Korsan martı siadenovirus (Grup A)		
Psitakin (Grup A)		Sincap mastadenovirus (Grup A)			
		Yarasa mastadenovirus (Grup A, B, C, D, E, F, G, H, I, J)			
		Geyik mastadenovirus (Grup B)			
		Yunus mastadenovirus (Grup A, B)			
		Kobay hayvanı mastadenovirus (Grup A)			
		Yassı burunlu maymun mastadenovirus (Grup A)			
		Kutup ayısı mastadenovirus (Grup A)			
		Deniz aslanı mastadenovirus (Grup A)			
		İnsan mastadenovirus (Grup A, B, C, D, E, F, G)			

Tablo 5: Hayvanlarda görülen başlıca AdV enfeksiyonları (Ivanics ve ark., 2010; MacLachlan ve Dubovi, 2017; Mittal ve ark., 2016; Zakhartchouk ve ark., 2002; Chenier ve ark., 2019).

Hayvan türü	Tip Sayısı	Hastalık
Köpek	2	Enfeksiyöz canin hepatit Enfeksiyöz solunum hastalığı
At	2	Üst/ alt solunum yolu enfeksiyonları
Sığır	7	Gastrointestinal sistem ve solunum yolları hastalıkları
Maymun	15	Solunum yolları enfeksiyonları Konjonktivit Pankreatit Hepatit
Domuz	3	Solunum yolları enfeksiyonları Enterik enfeksiyonlar Ensefalit
Koyun	9	Solunum yolları enfeksiyonları Enterik enfeksiyonlar
Geyik	1	Sistemik ve lokal vaskülit Pulmoner ödem Oral kavitede hemoroji ve ülserler
Kümes hayvanları	12	Dalak büyümesi
Hindi	5	Hemorajik enterit
Ördek	2	Nefes darlığı, öksürük, dispnea
Tavuk	1	Tavuklarda Egg Drop Sendromu
Balık	1	Epidermal hiperplazi Epidermal papillom
Kaz	3	Klinik respiratorik belirtiler Hepatit

2.3.7.5. Adenovirusların İnsanlarda Yaygınlığı

HAdV'lar ateşlenme, alt ve üst solunum yollarına ait semptomlarla seyreden hastalıklar, pnömoni, akut solunum yolu enfeksiyonu, menenjit, hepatit, hemorajik sistit, konjonktivit ve keratokonjonktivit gibi hastalıkların yaygın sebeplerindendir (Powledge ve ark., 2004; Pond ve DSÖ, 2005; Borkenhagen ve ark., 2019).

HAdV enfeksiyonları oldukça yaygın seyretmekte olup bir çok insanın 10 yaşına kadar enfeksiyonu geçirdiğine dair serolojik bulguların olduğu belirtilmiştir (Rhee ve Barouch, 2015). HAdV'ların sebep olduğu alt solunum yolları enfeksiyonları ise sık görülmez, sporadiktir ve genellikle HAdV 3, HAdV 5 ve HAdV 7 ile ilişkilidir (Pond ve DSÖ, 2005). HAdV enfeksiyonları özellikle küçük çocuklarda solunum yoluyla bulaşsa da gastrointestinal enfeksiyon semptomlarına neden olmaktadır. Küçük çocuklarda görülen akut solunum hastalığının sıklıkla HAdV 1, HAdV 2 ve HAdV 5 tiplerinden kaynaklandığı ve virusun aylar hatta yıllar boyunca adenoid dokuda asemptomik enfeksiyonlar şeklinde kalarak aralıklarla virusu saçtığı belirtilmektedir (Heim ve ark., 2003). HAdV 40 ve HAdV 41'in gastrointestinal sisteme afinitesi sebebiyle sıklıkla gastroenterit ve diyareye sebep olmakta ve nadiren de hemorajik kolit, hepatit ve pankreatite neden olmaktadır (Lynch ve Kajon, 2016; Pond ve DSÖ, 2005). Ayrıca lokal gatstroenterit salgınlarında küçük çocuklarda HAdV 31'in de izole edildiği bildirilmiştir (Heim ve ark., 2003). HAdV'ların sebep olduğu bir diğer hastalık tablosu olan keratokonjonktivitten sorumlu tipler arasında HAdV 3, HAdV 4, HAdV 7, HAdV 11 ve HAdV 14 sayılmaktadır (Kitamura, 2001; Lynch ve Kajon, 2016). Epidemik keratokonjonktivite neden olan en yaygın tipler ise HAdV 8, HAdV 19 ve HAdV 37'dir (Lynch ve Kajon, 2016, Heim ve ark., 2003). HAdV 36'nın ise obezite ile bir ilişkisi olduğu tahmin edilmektedir (Powledge ve ark., 2004; Hur ve ark. 2013; Pond ve DSÖ, 2005). Sistite sebep olan tipler arasında HAdV 11, HAdV 21, HAdV 34 ve HAdV 35 gösterilmekte ve bu tiplerin üriner sistemde asemptomatik şekilde kalmaya meyilli oldukları belirtilmektedir. HAdV 19 ve 37'nin ise cinsel yolla da bulaştığı, ülseratif genital lezyonlar, servisit ve üretritle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Heim ve ark., 2003).

Bazı HAdV tiplerinde enfeksiyonla ilişkili hastalığın klinik spektrumu enfeksiyonun yerine göre değişmektedir. Örneğin inhalasyon yoluyla bulaşan HAdV 7, şiddetli alt solunum yolu hastalığıyla ilişkiliyken virusun oral yolla bulaşması durumunda ya hafif şiddetle hastalık oluşur ya da oluşmaz (Pond ve DSÖ, 2005).

HAdV'ların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre belirlenen gruplarının (Grup A-G) HAdV'lar için dağılımı ile her bir gruba ait tipler ve insanlarda yaptığı hastalıklar Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: HAdV grupları, tipleri ve oluşturduğu hastalıklar (Crenshaw ve ark., 2019; Murtagh ve ark., 1993; Ghebremedhin 2014)

Grup	Tip	İlgili Hastalık veya Enfeksiyonlar
A	12, 18, 31, 61	Gastrointestinal enfeksiyon, solunum yolu enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu, kriptik enterik enfeksiyon, obeziteyle ilişki, meningoensefalit
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66, 68	Konjonktivit, gastrointestinal, solunum yolu enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni, meningoensefalit, sistit
C	1, 2, 5, 6, 57	Solunum yolu enfeksiyonu, gastrointestinal enfeksiyon, pnömoni, hepatit
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	Konjonktivit, gastrointestional enfeksiyon, obeziteyle ilişki, meningoensefalit
E	4	Konjonktivit, solunum yolu enfeksiyonu, pnömoni
F	40, 41	Gastrointestinal enfeksiyon
G	52	Gastrointestinal enfeksiyon

Çocuklarda akut alt solunum yolu enfeksiyonları dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur (Murray ve Lopez., 1996). Schwartz ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada HAdV'ların çocuklarda merkezi sinir sistemi hastalığının az rastlanan

nedenlerinden biri olabileceği gösterilmiştir. Hastalık spektrumu hafif aseptik menenjit ve tamamen geri dönüşümlü ensefalopatiden, şiddetli ve potansiyel olarak ölümcül, akut nekrotizan ensefalopatiye kadar değişkendir. ABD'de 1 Nisan 2007- 21 Haziran 2007 tarihleri arasında 57 askeri personel pnömoni şikayetiyle hastaneye başvurmuş, başvuranların içinden 25 kişinin hastaneye yatışı gerçekleşmiş, 4 kişi yoğun bakım ünitesine alınmış, kalan 32 kişi de ayakta tedavi edilmiştir. Hastaneye yatışı gerçekleşen hastalardan 15'inde, yoğun bakım ünitesine alınan hastalardan 2'sinde ve ayakta tedavi edilen hastalardan 14'ünde yapılan incelemelerde toplam 24 kişide HAdV tespit edildiği belirtilmiştir. Pozitif çıkan 24 vakanın yalnızca 9 tanesi için tiplendirme çalışmasının yapıldığı ve HAdV 14 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Brosch ve ark., 2009).

HAdV'ların neden olduğu, konjonktival ödem, kızarıklık, akıntı, gözde ağrı ve bulanık görme semptomları ile kendini gösteren ve 1941 yılında Hawaii'nin Pearl Harbor bölgesinde 10.000'den fazla vakanın dahil olduğu bir epidemik keratokonjonktivit salgını bildirilmiş, ardından San Francisco'da da binlerce kişinin etkilendiği belirtilmiştir. Vakaların çoğunun tersanelerde çalışıyor olması sebebiyle "shipyard eye" (tersane göz) olarak adlandırılmıştır (Ismail ve ark., 2019). Pensilvanya'da 2016-2017 yılları arasında kolej öğrencileri arasında grip benzeri bir hastalık salgını olduğu bildirilmiş ve yapılan incelemeler sonucunda bildirilen 1149 vakanın 288 tanesinden alınan nazofarengeal svablardan 44 tanesinde HAdV tespit edilmiştir. Moleküler tiplendirme sonucu etkenlerin HAdV 1, HAdV 3, HAdV 4 ve HAdV 7 olduğu bildirilmiştir (Biggs ve ark., 2018). HAdV 7'nin neden olduğu bir başka lokal salgın da ABD'nin New Jersey eyaletinde 2017 yılında gerçekleşmiştir. 79 vakadan 4 tanesinin hastaneye yatışı gerçeklemiş, 3 tanesi de ölümle sonuçlanmıştır (Rozwadowski ve ark., 2018). Eylül 1984-Eylül 1988 tarihleri arasında Buennos Aires'de yapılan bir çalışmada pediatrik akut alt solunum yolu hastalığı şikayeti bulunan 1 yaşından küçük 1233 çocuğun %2.4'ünde HAdV 7 tespit edilmiştir (Murtagh ve ark., 1993).

HAdV, özellikle HAdV 40 ve HAdV 41, çocukluk çağı gastroenteritinin bir nedeni olarak önemi bakımından rotavirusun ardından ikinci sırada yer almaktadır (Crabtree ve ark., 1997; Mickan ve Kok, 1994; Gülen ve Hacımustafaoğlu, 2013; Bachofen, 2018). Uhnoo ve ark. (1986) İsveç'te akut gastroenterit tanısıyla hastaneye başvuran 15 yaşından küçük 432 çocuğun 14'ünde HAdV 40 ve 18'inde HAdV 41 tespit etmişlerdir. Houstan, Teksas'da 1986 yılı Haziran ayı ile 1991 yılı Nisan ayını kapsayan

bir çalışmada, bu tarihler arasında çıkan salgınlarda 9 farklı çocuk yuvasındaki 6-24 aylık 613 çocuktan toplanan toplam 4402 adet dışkı numunesinde HAdV 40 ve HAdV 41 araştırılmıştır. 249 çocuktan 94 tanesinde enterik HAdV tespit edilmiştir. Pozitif tespit edilenlerin arasından 51 çocuğun semptomatik, 43 çocuğun ise asemptomatik olduğu bildirilmiştir (Van ve ark., 1992). Japonya'da Maizuru şehrinde akut gastroenterit vakalarının görüldüğü bir salgında bebeklerden ve çocuklardan toplanan 337 dışkı örneğinin 27 tanesinde HAdV tespit edilmiş ve tiplendirme yapıldığında HAdV 1, HAdV 2, HAdV 3, HAdV 5 ve HAdV 41 oldukları bildirilmiştir (Shimizu ve ark., 2007).

İran'da yapılan bir çalışmada, akut gastroenterit şikayeti bulunan 5 yaşından küçük 1052 çocuktan alınan dışkı numuneleri incelenmiş ve 27 çocuğun HAdV 40 ve 41 açısından pozitif olduğu bildirilmiştir. Bulgular ışığında HAdV 40 ve 41 enfeksiyonlarının kış aylarında pik yaptığı ve 24 aydan küçük çocuklarda enfeksiyonun oranı ile daha büyük çocuklardaki enfeksiyon oranı arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,001$) belirtilmiştir (Modarres ve Jam-Afzon, 2006). Wiegering ve arkadaşlarının (2011) Almanya'da yaptığı bir çalışmada 650 hastanın 58'inde (%9,7) HAdV pozitifliği saptanmıştır. Japonya'da Nakanishi ve arkadaşlarının (2009), viral enterik ajanları saptamak üzere yaptıkları çalışmada HAdV pozitifliği %4,8 olarak bildirilmiştir. Çin'de Zhang ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada hastaneye yatışı gerçekleşen 5 yaşından küçük 201 çocuğun dışkı örnekleri incelenmiş ve %5 oranında HAdV pozitifliği bulunmuştur.

Türkiye'de Varışlı ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada akut gastroenterit ön tanısıyla hastaneye başvuran hastalardan alınan dışkı örneklerinde HAdV pozitifliğinin en yüksek olarak 0-2 yaş arası çocuklarda tespit edildiği ve özellikle bahar aylarında HAdV enfeksiyonlarının arttığı saptanmıştır. Kahramanmaraş'ta 1 Nisan 2018 - 31 Mart 2019 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada, akut gastroenterit tanısı konulan hastalardan alınmış olan dışkı numuneleri retrospektif olarak incelenmiş ve 2737 dışkı numunesinin 91 tanesinde HAdV tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı araştırmada, HAdV pozitifliğinin yaş grupları ile arasında anlamlı bir ilişki olduğu ancak mevsimsel dağılım ile arasında anlamlı bir ilişki saptanmadığı belirtilmiştir (Kirişçi ve Muratdağı, 2019). Bir başka retrospektif çalışma da Elazığ ilinde yapılmıştır. Gastroenterit şüphesi bulunan vakalardan 1 Aralık 2015-30 Kasım 2017 tarihleri arasında çeşitli poliklinik ve servislerden alınan dışkı örnekleri laboratuvarda incelenmiş, 6618 örnekten 170 tanesi

HAdV açısından pozitif bulunmuş ve yaz aylarında bu oranların daha çok görüldüğü bildirilmiştir (Aytaç ve ark., 2020).

Sivas ilinde yapılan retrospektif bir çalışmada ishal şikayeti bulunan vakalardan alınan 2988 adet dışkı örneğinin incelemesinde 1082 örnekte viral antijen tespit edilmiş, viral antijen tespit edilen örneklerin 307 tanesinin HAdV açısından pozitif olduğu bildirilmiştir (Karagün ve ark., 2014). Kızılırmak ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir çalışmada 1080 çocuğun 65'inde (%6) HAdV pozitifliği saptanmıştır. Altındiş ve ark. (2016) ülkemizde yapılan çalışmalarda HAdV sıklığının %7.8-10 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Coşkun ve Kasap (2019) tarafından Ocak 2017-Ocak 2018 tarihleri arasında Tokat'ta ishal bulgusu olan 1608 çocuktan alınan dışkı örneklerinde 30 çocukta (%1.8) HAdV 40 ve HAdV 41 açısından pozitiflik tespit etmişlerdir.

2.3.8. Adenovirusların Tanısı

İnsanların klinik materyallerinden HAdV saptanmasına yönelik laboratuvar tanı yöntemleri içerisinde virus izolasyonu her ne kadar altın standard olsa da virusların hücre kültürlerinde izolasyon zorluğu, kan gibi bazı klinik materyallerde metot sensitivitesinin olmaması gibi olumsuz yönleri de mevcuttur (Heim ve ark., 2003; Lynch ve Kajon, 2016). Ayrıca bazı HAdV tipleri kültürde çok yavaş ve etkisiz bir büyüme gösterirler veya izolasyon için 293 Graham hücre kültürü gibi bazı özel hücre hatlarına ihtiyaç duyarlar (Heim ve ark., 2003). Tiplendirme ise tip spesifik antiserum ile hemaglütinasyon inhibisyon ve nötralizasyon testleri ile yapılabilir (Garcia Zalisnak ve ark., 2018). Bu sebeplerle daha hızlı ve spesifik tanı yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Moleküler tanı yöntemleri bu konuda çok önemli katkılar yapmaktadır.

Etkilenen dokulardan alınan biyopsi örneklerinin HAdV'ların neden olduğu çekirdek içi inklüzyonlarını ortaya çıkarabildiği, immunohistokimyasal boyamanın da dokudaki HAdV hekzon antijenini tespit edebileceği bildirilmiştir (Lynch ve Kajon, 2016).

Florasan antikor gibi immunotestler ve PCR, DNA prob testleri gibi genomik testler klinik numunelerde ve doku kültürlerinde HAdV varlığını tespit etmek, tiplendirmek ve gruplandırmak için kullanılabilir (Murray ve Lopez, 1996).

Epidemiyolojik amaçlar dışında serolojik testler çok nadir kullanılmaktadır (Murray ve Lopez, 1996).

PCR analizleri hem HAdV varlığının tespit edilmesini hem de tipin belirlenmesini sağlar (Garcia Zalisnak ve ark., 2018).

Real-time PCR analizleri kantitatif olup virus kopya sayısını tespit eder ve testin optimizasyonu ile validasyonu şarttır. Ancak yeni AdV tipleri varyantları çıktıkça testin hatalı negatif sonuç verme olasılığı olduğu da belirtilmektedir (Alsaleh ve ark., 2014). Gıdalarda virusların tespit edilmesine yönelik moleküler tanı için spesifik kitler bulunmamaktadır.

2.3.9. Adenovirusların Dayanıklılığı ve İnaktivasyonu

AdV'ların zarfsız olması, kapsid yapısı ve çift iplikçikli DNA'lı virus olması sebebiyle dayanıklı olması beklenmektedir. AdV'lar sıvılarda ve kuru yüzeylerde uzun süre boyunca canlı kalabilmektedir (Berk, 2013). Genomun büyüklüğü ile kapsid stabilitesi arasında da bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Saha ve ark., 2014; Smith ve ark., 2009).

AdV'ların inaktivasyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada 21 farklı germisit, epidemik keratokonjonktivite neden olan HAdV 8'i inaktive etme yeteneği açısından test edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında oftalmolojik aletlerin %70'lik etil alkol ile veya 5000 ppm klor içeren çözeltiler ile dezenfekte edilmesini, yüzeylerin ise 1900 ppm klor, %0.63 kuaterner amonyum içeren %65 etanol veya %0.1 kuaterner amonyum içeren %79'luk etanol ile dezenfekte edilmesi önerilmiştir (Rutala ve ark., 2006).

Klordioksit ve sodyum hipoklorit'in hem HAdV hem de CAdV üzerindeki antiviral aktivitesi incelenmiş ve klordioksitin antiviral etkisinin sodyum hipokloritten 10 kat daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Klordioksitin 1 ile 100 ppm konsantrasyonlarında 15 saniyelik bir sensitizasyon sonucu virusların $\geq$ %99.9'unu inaktive ettiği gösterilmiştir (Sanekata ve ark., 2010).

Bir başka çalışmada şehir atık suları ozon ile muamele edilmiş, bunun sonucunda da HAdV 40'ın inaktivasyonu için başarılı olduğu görülmüştür (Thurston Enriquez ve ark., 2005). Havuzlarda klorlama uygulamasının da bulaşmayı azaltabileceği bildirilmektedir (Murray ve Lopez, 1996).

AdV'ların şehir atık sularının üçüncül arıtma ve UV ışınları ile muamele edilmeye karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Thompson ve ark., 2003; Thurston Enriquez ve ark., 2003).

2.3.10. Adenovirus Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol

Halk sağlığında kullanılmak üzere bir HAdV aşısı henüz yoktur. Yalnızca HAdV 4 ve HAdV 7 tipleri için askeri öğrencilerde kullanılmak üzere ABD'de onaylanmış canlı bir oral aşı mevcuttur ve birincil korunma yöntemi olarak kullanılmaktadır. HAdV 4 ve HAdV 7'ye karşı oluşan antikorların diğer HAdV tipleri için de çapraz koruma sağlayabileceği belirtilmektedir (Lynch ve Kajon, 2016; Chen ve Tian, 2018). İkincil korunma yöntemi ise kişisel hijyenin artırılması, kalabalığın azaltılması gibi önlemlerdir (Gray ve Erdman, 2018).

HAdV enfeksiyonları için onaylı bir tedavi şekli yoktur ancak immun sistemi baskılanmış enfekte kişilerde sidofovir ve ribavirinin kullanılabileceği belirtilmektedir (Murray ve Lopez, 1996).

HAdV enfeksiyonlarına karşı ticari bir aşının ve onaylı bir tedavinin olmaması sebebiyle, korunmaya yönelik önlemlerin üzerinde durulmaktadır. Hijyenin sağlanması, ellerin yıkanması, hasta kişilerle temas etmekten kaçınma, çatal, kaşık, bardak gibi eşyaların paylaşılmaması gibi önlemlerle bulaşmadan korunma önerilmektedir. Ayrıca virusların inaktivasyonuna yönelik uygulamaların yapılması da önerilmektedir (O'Shea ve ark., 2019).

Türkiye'de ve dünyada yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, HAdV 40 ve HAdV 41'in 5 yaşından küçük çocuklarda gastroenterite neden olduğu görülmektedir (Modarres ve Jam-Afzon, 2006). Enfeksiyonun kaynağı kesin olarak bilinmemekle birlikte gıda kaynaklı olma ihtimali göz önüne alındığında gıda işleme, hazırlama ve pişirme aşamalarında hijyenik tedbirlerin artırılması bu enfeksiyondan korunmanın en önemli adımlarından biridir. Bu amaçla gıda üretim zincirinin herhangi bir aşamasında yer alan tüm işletmelerin tabi olduğu standartlar HACCP (Hazard Anaylsis and Critical Control Points: Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları) ve ISO 22000 standartlarıdır.

Bu standart, gıda üreten işletmelerde hammadde alımından başlayarak mamul ürünün tüketiciye sunulmasına kadar geçen süreçte insan sağlığı için risk potansiyeli

oluşturan fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelerin ortadan kaldırılması veya kabul edilebilir seviyelere düşürülebilmesi için alınması gereken tüm önlemleri içeren bir risk yönetim sistemidir. HACCP standartları, gıda işletmesinde tehlike analizi, kritik kontrol noktalarının ve kritik limitlerin belirlenmesi, kontrollerin devamlılığı ve gerektiği durumlarda düzeltici faaliyeterin belirlenmesi ve uygulanması ilkelerine dayanarak güvenli gıda üretimini hedeflemektedir (Karaali, 2003). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yayınlanan 26 Eylül 2008 tarih ve 27009 sayılı "Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmelik" gereği gıdayı üreten, işleyen ve dağıtan işletmelerin HACCP prosedürlerini uygulama zorunluluğu bulunmaktadır (Resmi Gazete, 2008). Çeşitli gıdalarda kabul edilebilir mikrobiyolojik limitlerin belirlenebilmesi için, ICMFS (International Commission on Microbiological Specifications for Food) gibi bazı otoritelerin yayınları referans alınabilir (Moberg, 1995).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

3.1.1. Gıda Örnekleri

Bu çalışmada gıda örnekleri olarak İstanbul ilinin çeşitli bölgelerinden toplanan çiğ etler (kıyma, paketli kıyma, paketli köfte, tavuk kanat, tavuk göğüs eti, dökme piliç, soslu kanat, taze balık, donmuş balık, taze midye, donmuş midye, kalamar) ve tüketime hazır et ürünleri (sucuk, dana salam, tavuk salam, dana sosis, tavuk sosis, piliç jambon, şinitzel, ton balığı) kullanıldı. Örnekler 2016 yılının Ekim ayı ile 2017 yılının Aralık ayları arasında toplandı.

Örneklerin seçiminde kontamisyon kaynakları açısından insan faktörü en riskli grup olduğu için mümkün olduğu kadar işleme tabi tutulan örnekler dikkate alındı. Ülkemizde deniz ürünleri hariç gıda örneklerinde HAdV saptanmasına yönelik bir çalışmaya rastlanılmadığı için epidemiyolojik veri tablosuna göre tahmini prevalans %50, %95 güven aralığında ve %10 en az hata oranında 96 örnekten daha az olmamak üzere, ve her biri en az 100 g olmak üzere Tablo 7'de ayrıntıları belirtilen toplam 100 adet örnek bu çalışmanın materyallerini oluşturmuştur.

Tablo 7: Gıda örneklerinin miktarı ve ürün grupları

Ürün Grubu	İşlenmiş /İşlenmemiş	Ürün	Paket*
Kırmızı et	İşlenmemiş	Kıyma	5
		Paketli kıyma	5
	İşlenmiş	Paketli köfte	5
		Sucuk	5
		Salam	5
		Sosis	5
Beyaz et	İşlenmemiş	Tavuk kanat	5
		Göğüs eti	5
		Dökme piliç	5
		Soslu kanat	5
		Şinitzel	5
	İşlenmiş	Jambon	5
		Sosis	5
		Salam	5
Deniz ürünleri	İşlenmemiş	Balık	5
		Midye**	5
	İşlenmiş	Donmuş balık	5
		Donmuş midye	5
		Donmuş kalamar	5
		Ton balığı	5
Toplam			100

*Her bir paket, en az 100 g gıda örneği içermektedir.

** Her bir midye paketi en az 15 adet midye içermektedir.

3.1.2. Moleküler Teşhis Materyalleri

3.1.2.1. Viral DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu için Roche High Pure Viral Nucleic Acid (Katalog no: 11858874001) ticari kiti kullanıldı ve kitin içerisinde yer alan çalışma protokolü takip edildi. Ticari kit; Elution Buffer, Binding Buffer, Wash Buffer, Removal Buffer, Poly A, Proteinase K, filtreler ve tüplerden oluşmaktadır.

3.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmanın birinci aşamasında HAdV varlığını tespit etmek amacıyla insanlardaki tüm HAdV tipleri için ortak gen bölgesinden (Hekzon) seçilen primerler ile panadenovirus taraması yapılmıştır. Panadenovirus için PCR çalışmasında hekzon geninin 896 bp uzunluğundaki gen bölgesini çoğaltan primer çifti kullanıldı.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise panadenovirus PCR sonuçları pozitif çıkan örneklerde HAdV 40 ve HAdV 41 hekzon geninin 261 bp uzunluğundaki gen bölgesine spesifik primer kullanıldı. Gıdalarda HAdV'un tespit edilmesi amacıyla HAdV 40 ve HAdV 41'in hekzon gen bölgesi hedeflendi.

PCR ile teşhis amacıyla Promega marka GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Katalog no: M7805) isimli ticari kit kullanıldı. Ticari kitin içeriği; 10mM dNTP, $MgCl_2$, 5X Green Go Taq Flexi Buffer, Go Taq Flexi DNA Polimerase'dan oluşmaktadır.

Elde edilen PCR ürünlerini yürütmek için, 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) çözeltisi, Sigma marka agaroz (Katalog No: A9539-100G), Applichem ethidium bromide (Katalog No: A1152,0025) ve 100bp'lik DNA marker (Promega Katalog no. G210) kullanıldı.

Tablo 8: HAdV tespiti için kullanılan primerlerin dizilimleri

Hedef Gen Bölgesi	Primer Adı	Primer Dizilimi	Bulunduğu Bölge	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
Hekzon	Panadenovirus F	5-TIC TTT GAC ATI CGI GGI GTI CTI GA-3	19.135 – 19.160	896	Lu et al, 2006
	Panadenovirus R	5-CTG TCI ACI GCC TGR TTC CAC A-3	20.009- 20.030		
Hekzon	Tip 40&41 HAdV Fhex F	5-GCC ACC GAT ACC TAC TTC AGC CTG-3	100-123	261	Dey R. S. ve ark., 2011
	Tip 40&41 HAdV Fhex R	5-GGC AGT GCC GGA GTA GGG TTT AAA-3	337-360		

3.1.2.3. Pürifikasyon Kiti

Pozitif bulunan örneklerin, sekans işleminden önce PCR ürünlerinin pürifikasyonu için Roche marka High Pure PCR Product Purification Kit (Katalog No: 1173267600) isimli ticari kit kullanıldı.

3.1.2.4. Pozitif Kontroller

a) Panadenovirus için yapılan PCR pozitif kontrolleri

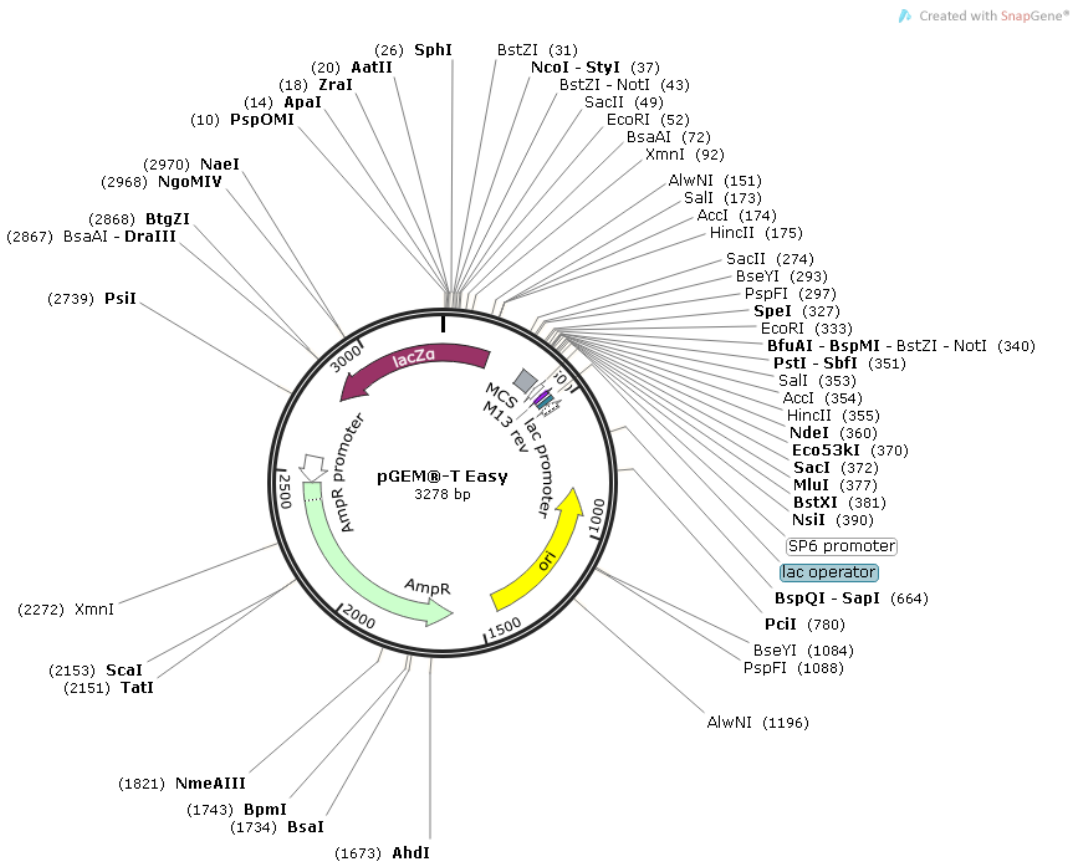
Pandenovirus taramasında PCR çalışmalarında pozitif kontroller olarak Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden temin edilen HAdV 5 ile İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından temin edilen HAdV 36 kullanıldı.

b) HAdV 40 ve HAdV 41 için yapılan PCR pozitif kontrolleri

Çalışmanın ikinci aşamasında ise HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerine ait pozitif kontrol temin edilemediğinden, bu tiplerin spesifik Hekzon gen bölgelerinin 261 bp'lik bölümü pGEM®-T Easy vektörüne klonlanması için özel bir firmadan (Sentebiolab) hizmet alımı yapıldı ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. Şekil 5'de plazmid haritası ve Şekil 6'da plazmid dizisi gösterilmiştir.

Vektör adı: pGEM®-T Easy-Adeno

İstenilen sekanstaki DNA dizisi vektörde Adeno#3/ Insert olarak belirtilen pozisyonda yer almaktadır.



Şekil 5: HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin plazmid haritası



Şekil 6: HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin plazmid dizisi

3.1.2.5. Negatif Kontrol

Çalışmada negatif kontrol olarak ddH_2O kullanıldı.

3.1.2.6. Moleküler Testlerde Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar

Toplanan gıda örneklerinin homojenizasyonu amacıyla Seward Stomacher® 400 Circulator kullanıldı. PCR çalışmalarında ise SensoQuest Labcycler termosiklus cihazı kullanıldı. DNA miktarının ölçülmesi için Thermoscientific marka NanoDrop 1000 Spectrophometer cihazı kullanıldı. Jel elektroforez yönteminde PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi amacıyla Cleaver yatay jel elektroforez tankı ve görüntüleme için Kodak gel logic 200 görüntüleme sistemi kullanıldı.

3.1.3. Virus İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

3.1.3.1. Hücre Kültürü

PCR analizleri sonucunda panadenovirus yönünden pozitif bulunan örneklerin, hücre kültüründe virus izolasyon çalışmaları için HEp-2 hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünde gerçekleştirildi.

3.1.3.2.Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Adenovirus İzolatı

PCR analizlerinde panadenovirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinin hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmalarında pozitif kontrol olarak Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden temin edilen HAdV 5 kullanıldı.

3.1.3.3.Hücre Üretme Vasatı

HEp-2 hücrelerinin çoğaltılması amacıyla Gibco marka ticari EMEM (Katalog No: 51200087) vasatı kullanıldı. Hücrelerin çoğaltılması amacıyla %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 konsantre antibiyotik çözeltisi içeren EMEM kullanıldı.

3.1.3.4.Phosphat Buffer Saline (PBS)

Wicent marka ticari PBS (Katalog No: 311-010) kullanıldı.

3.1.3.5.Tripsin EDTA Çözeltisi

Flasklarda çoğaltılan adherent hücrelerin yüzeyden kaldırılması için Sigma Aldrich marka ticari Tripsin-EDTA çözeltisi kullanıldı (Katalog No: T4049).

3.1.3.6.Fötal Bovine Serum (FBS)

Hücre kültürü çalışmalarında Biochrom (Katalog No:S0115) marka ticari Fötal Dana Serumu kullanıldı.

3.1.3.7.Antibiyotik Çözeltisi

Antibiyotik çözeltisi için Applichem marka ticari Penisilin G (Katalog No:1837,0025) ve Streptomisin Sulfate (Katalog No : A1852,0025) kullanıldı.

3.1.3.8.L-Glutamine

Wisent Bioproduct marka ticari L-glutamine (Katalog No:609-065EL) kullanıldı. Ürünün içeriğinde 200 mM/lt L-glutamine bulunmaktadır.

3.1.3.9.Virus Üretme Vasatı

%1 antibiyotik çözeltisi içeren Gibco (Katalog No 11095080) EMEM vasatı kullanıldı.

3.2.YÖNTEM

Balık pazarı, süper market, kasap ve restoranlardan toplanan örnekler steril kaplara alındı ve soğuk zincirde laboratuvara getirildikten sonra örneklerin

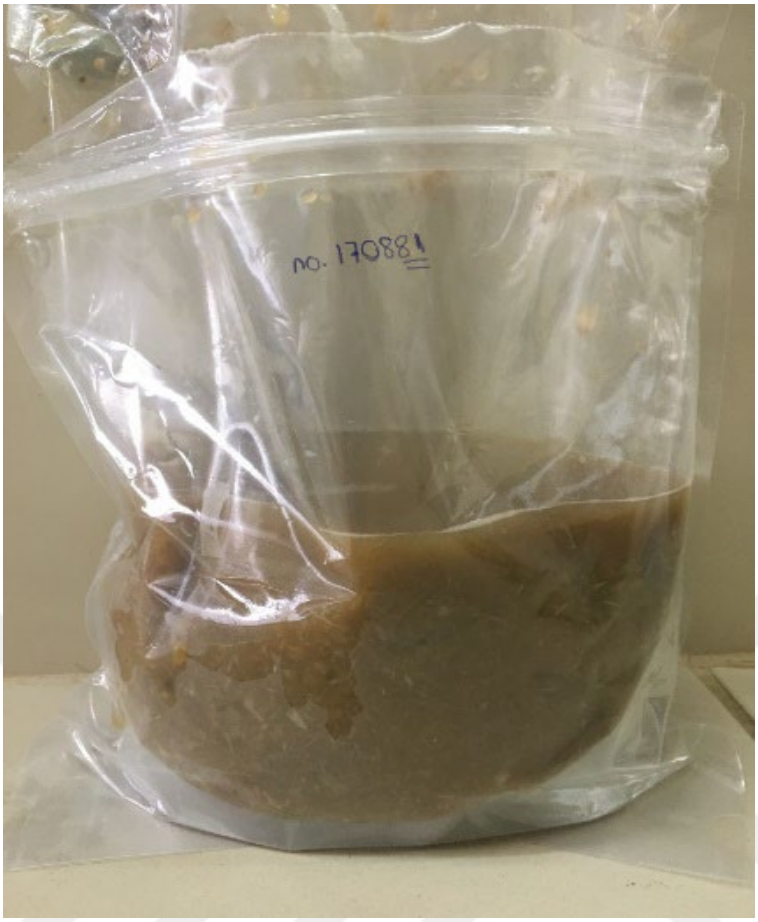
homojenizasyonu, DNA ektraksiyonu, PCR analizleri, jel elektroforez işlemleri, hücre kültürü izolasyonları ve sekans işlemleri yapıldı.

3.2.1. Gıda Örneklerinin Homojenizasyonu

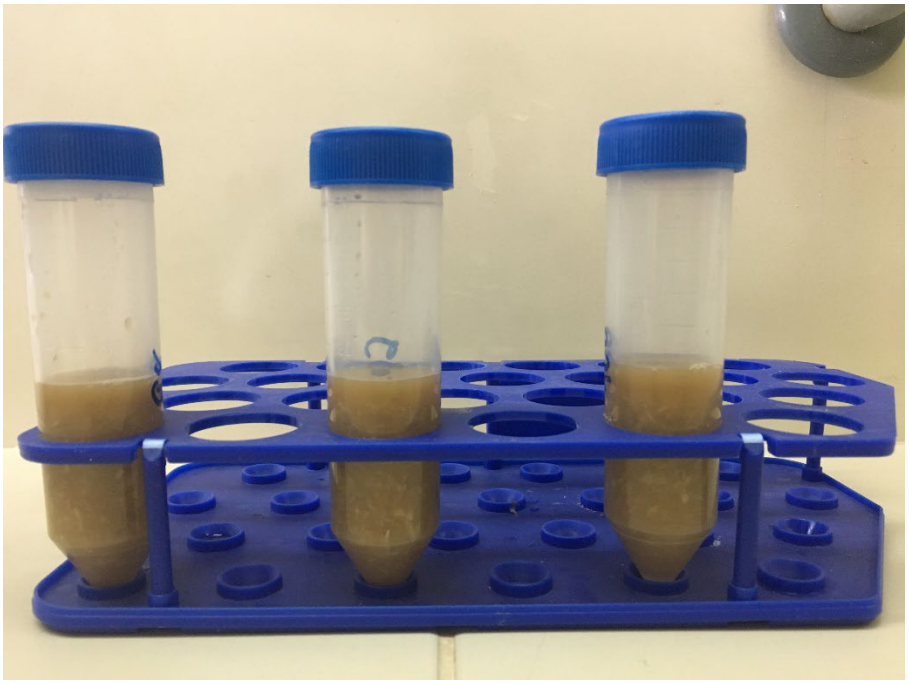
Steril kaplarda toplanan ve her biri en az 100 g olan numaralandırılmış, işlenmiş ve işlenmemiş gıda örnekleri steril bistüri ucu ile küçük parçalar haline getirildi (Şekil 7) ve ardından numaralandırılmış steril poşetlere aktarıldı. Steril poşetlerdeki gıda örneklerinin üzerine 100 ml PBS çözeltisi eklenerek homojenizatörde 10 dakika boyunca homojenize edildi (Şekil 8). Steril poşetin içerisindeki üst sıvı 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı (Şekil 9) ve gıda artıklarının çökeltilmesi amacıyla 30 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edildi. Pipet yardımıyla üst sıvı toplanarak 15 ml'lik tüplere ikişer örnek olacak şekilde bölündü (Şekil 10). Moleküler çalışmalarda kullanılacak olan ilk tüpler -20^{0}C'de, virus izolasyon çalışmasında kullanılacak olan ikinci tüpler ise -80°C'de saklandı.



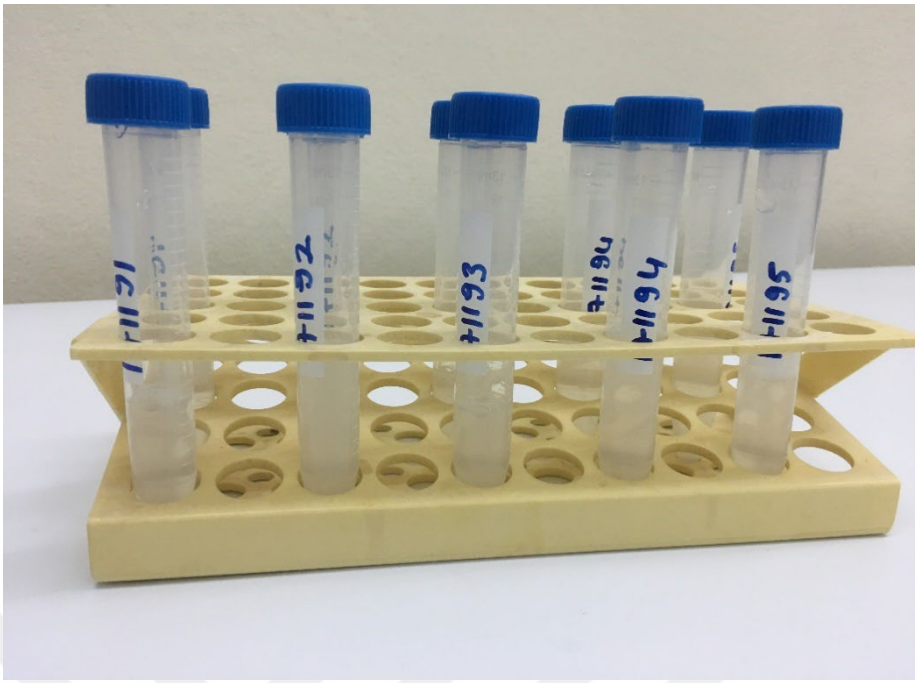
Şekil 7: Homojenize edilmek üzere hazırlanan midye örneği



Şekil 8: Homojenize edilmiş örnek



Şekil 9: Santifüj öncesi 50 ml.'lik santrifüj tüplerine aktarılan örnekler



Şekil 10: Falkon tüplerde saklanan homojenat üst sıvıları

3.2.2. Moleküler Teşhis Çalışmaları

3.2.2.1. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu

-20^0 C'de saklanan homojenatlar oda ısısında çözdürüldükten sonra viral nükleik asit ekstraksiyon kiti içerisinde yer alan protokole uygun şekilde, aşağıda belirtilen adımlar uygulanarak ekstrakte edildi:

1. 2 ml'lik ependorf tüpte (örnek sayısı x 4 µl Poly A) + (örnek sayısı x 200 µl binding buffer) karışımı hazırlandı.
2. Her bir örnekten 200 µl, 2 ml'lik ependorf türlere ayrı ayrı konuldu ve üzerlerine 204 µl (Poly A + binding buffer) karışımı ve 50 µl Proteinaz K eklendi.
3. Karışım derhal vortekslenerek 72ºC'de 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra her bir tüpe 100 µl binding buffer eklenerek vortekslendi ve toplama tüplerindeki kolonlara aktarıldı.
5. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne takıldı.

7. 500 µl inhibitor removal buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Alt sıvı atılarak aynı toplama tüpü içerisine 450 µl wash buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Alt sıvı atılarak aynı toplama tüpü içerisine 500 µl wash buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Alt sıvı atılarak aynı toplama tüpü 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
11. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir 1.5 µl'lik ependorf tüpe aktarıldı.
12. Üzerine 50 µl elution buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Filtre atıldıktan sonra DNA -20^{0}C'ye kaldırıldı.

3.2.2.2. PCR Çalışmaları

Tablo 8'de yer alan primerler ile, Tablo 9'da belirtilen şekilde mastermiks hazırlandı. Her bir çalışma için 1 negatif kontrol (ddH_20) ve ilgili pozitif kontroller kullanılarak DNA amplifikasyonu Tablo 10 ve Tablo 11'e belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Hem Panadenovirus primerleri ile yapılan PCR, hem de HAdV 40 ve HAdV 41 primerleri ile yapılan PCR çalışmasında Tablo 9'da yer alan mastermiks içeriği kullanıldı.

Tablo 9: PCR Çalışmaları İçin Mastermiks İçeriği

Reaktifler	**Hacim**
5X buffer flexi color	5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl
dNTP	1 µl
Primer F 20 pmol	1 µl
Primer R 20 pmol	1 µl
Taq	0.5 µl
ddH_2O	31.5 µl
DNA	5 µl
Toplam Hacim	50 µl

Tablo 10: Amplifikasyon Şartları, Sıcaklık ve Süreler (HAdV Hex F1 & R1)

Reaksiyon Basamakları	**Sıcaklık (^{0}C)**	**Süre**	**Siklus Sayısı**
1. Başlangıç Denatürasyonu	94	2 dak.	1
2. Amplifikasyon: 2.1. Denatürasyon	94	1 dak.	
2.2. Bağlanma	50	1 dak.	35
2.3. Uzama	72	2 dak.	
3. Stabilizasyon	72	5 dak.	1
4. Soğutma	10		

Tablo 11: Amplifikasyon Şartları, Sıcaklık ve Süreler (HAdV 40 &41 F1 & R1)

Reaksiyon Basamakları	**Sıcaklık (^{0}C)**	**Süre**	**Siklus Sayısı**
1. Başlangıç Denatürasyonu	95	9 dak.	1
2. Amplifikasyon: 2.1. Denatürasyon	94	1 dak.	
2.2. Bağlanma	55	1 dak.	30
2.3. Uzama	72	1 dak.	
3. Stabilizasyon	72	7 dak.	1
4. Soğutma	10		

3.2.2.3. DNA Miktarının Saptanması ve PCR optimizasyonu:

Örneklerden elde edilen ve primerlerin çoğaltacağı DNA miktarları ve PCR testinin optimizasyonu çalışmaları için pozitif örnek olarak kullanılacak 10^6 $TCID_{50}$/ml oranındaki HAdV 5 hücre süpernatantları 10 katlı sulandırılarak DNA izolasyonları gerçekleştirildi, nanodrop ile DNA miktarları ölçüldü ve PCR uygulandı.

3.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforez

PCR işlemleri sonrasında elde edilen DNA'ların analizi için agar jel elektroforez yöntemi kullanıldı. %1.5'lik agaroz jel, 1X TAE buffer kullanılarak 100 ml hazırlandı. İçerisinde 7 µl ethidium bromide eklendi. Ardından, tarakları takılmış olan elektorforez tankına aktarıldı ve katılaşana kadar oda sıcaklığında bekletildi. Jelin katılaşmasını takiben taraklar çıkarıldı, ilk kuyucuğa 5 µl marker diğer kuyucuklara ise 10 µl PCR ürünü yüklendi. 45 dakika boyunca 100 voltluk elektrik akımı uygulanarak PCR ürünlerinin yürümesi sağlandı. Jel görüntüleme cihazında, UV ışığı altında gözlemlendi.

3.2.2.5. Elde Edilen PCR Ürününün Pürifikasyonu

PCR analizleri sonucunda pozitif bulunan örneklerin sekans işleminden önce, PCR ürünlerinin pürifikasyonu ticari kitin içerisinde yer alan protokole uygun şekilde, aşağıda belirtilen adımlar uygulanarak gerçekleştirildi:

1. 100 µl PCR ürününe, 500 µl Binding Buffer eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı.

2. Elde edilen ürün toplama tüplerindeki kolonlara transfer edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

3. Toplama tüpü atılarak kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

4. Üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

5. Alt sıvı atılarak aynı toplama tüpüne 200 µl Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Toplama tüpü atılarak, kolon 1,5 µl'lik ependorf tüpüne takıldı.

8. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi. 14.000 rpm 'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Kolon atıldı. Elde edilen nükleik asit sekans işlemi için -20°C'de saklandı.

3.2.2.6. Sekans İşlemleri

HAdV 40 ve HAdV 41 için yapılan PCR çalışmaları sonucunda pozitif bulunan örneklerin sekans işlemleri MedSanTek isimli firmada hizmet alımı gerçekleştirilerek yapıldı.

Sekans sonuçlarının değerlendirilmesi, Mega X genetik analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. NCBI gen bankasındaki referans genlerle karşılaştırıldı ve ardından filogenetik haritaları çıkarıldı.

3.2.3. Virus İzolasyon Çalışmaları

HAdV'ların bir çok tipinin, özellikle HAdV 40 ve HAdV 41'in HEp-2 hücre kültüründe kolaylıkla replike olması sebebiyle, virus izolasyon çalışmalarında HEp-2 hücre kültürü tercih edildi (Hierholzer ve Killington, 1996).

3.2.3.1. Hücrelerin Çözündürülmesi ve Pasajlanması

Sıvı azot tankında saklanan HEp-2 hücreleri 37ºC'de su banyosunda çözündürüldü ve 75 cm^2'lik flasklarda %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı ve ardından pasajlandı. Bunun için hücre kaplı flaska 2 ml Tripsin (% 0,25) çözeltisi eklendi ve 37°C'de %5 CO_2 ortamlı etüve kaldırıldı. Flasktan hücrelerin kalkmasının ardından flaska 5 ml hücre vasatı eklendi ve yüzey bu vasatla yıkandıktan sonra 15ml'lik tüplere alındı. 4°C'de 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra tekrar 5 ml vasat eklendi, pipetasyon işlemi yapıldıktan sonra tekrar santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Hücreler Thoma lamında sayılarak $2x10^4$ hücre/ml olacak şekilde 6 çukurlu plakalara alındı. Plakalarda hücrelerin monolayer oluşumu takip edildi ve virus inokulasyonu için hazır hale gelmesi beklendi (George ve ark., 1996).

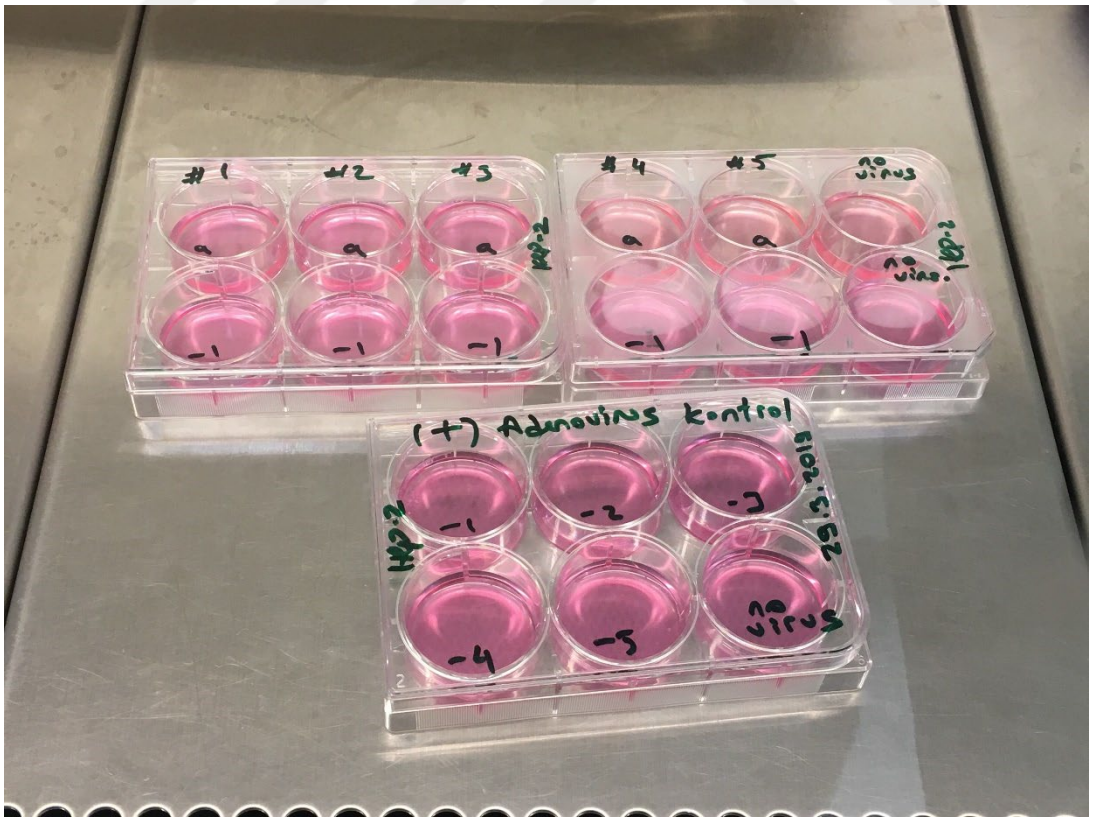
3.2.3.2. İnokulumun Hazırlanması

PCR ile panadenovirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinin (2 şinitzel, 2 soslu kanat ve 1 midye) 15ml'lik tüplerde -80 °C'de bekletilen örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü. 4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvısı 0.2 µm por çaplı membran filtrelerden geçirildi (George ve ark., 1996). Hücre kültürlerine ekim için kullanıldı.

3.2.3.3. HEp-2 Hücre Kültürüne İnokulasyon

Altı çukurlu plakalardaki tek tabaka (monolayer) HEp-2 hücre kültürlerine ekimler yapılmadan önce 3 kere serumsuz EMEM ile yıkandıktan sonra, filtre edilen inokulumlar sulandırılmadan (10^0) ve EMEM ile 10 katlı sulandırılarak (10^{-1}) her bir kuyucuğa pipet ile 200 µl olarak ekimi yapıldı. Bir saat 37°C'de %5 CO_2 ortamlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sürecinde her 15 dakikada bir hücre plakaları nazikçe sallanarak inokulumun yüzeye yayılması sağlandı. EMEM vasattan 3 ml eklendi. CPE oluşumu yönünden kontrolü yapılmak üzere 5 gün 37°C'de %5 CO_2 ortamlı etüvde inkübasyona bırakıldı (Arnold ve ark., 2009).

Hücrelerdeki değişimler 5 gün boyunca inverted mikroskop altında gözlemlendi. Beşinci gün sonunda plakaların çevresi parafilm ile kaplanarak -80°C'de 3 kez dondurulup çözündürüldü. CPE görünmeyen örneklerin ilk dilusyonlarının kuyucuktaki hücre süspansiyonları 15ml'lik tüplere alınarak 4°C'de 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları alınarak tekrar virus izolasyonu çalışması için kullanıldı. Örnekler bu yöntemle 5 kez kör pasaj yapıldı.



Şekil 11: Altı çukurlu plakalarda HEp-2 hücre kültürüne 10 katlı sulandırılan gıda örneklerinin ekimi

3.2.4. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi One-Way ANOVA ile yapılmıştır. Analiz için her bir gıda grubu içerisindeki pozitiflik oranı dikkate alınmıştır.

4. BULGULAR

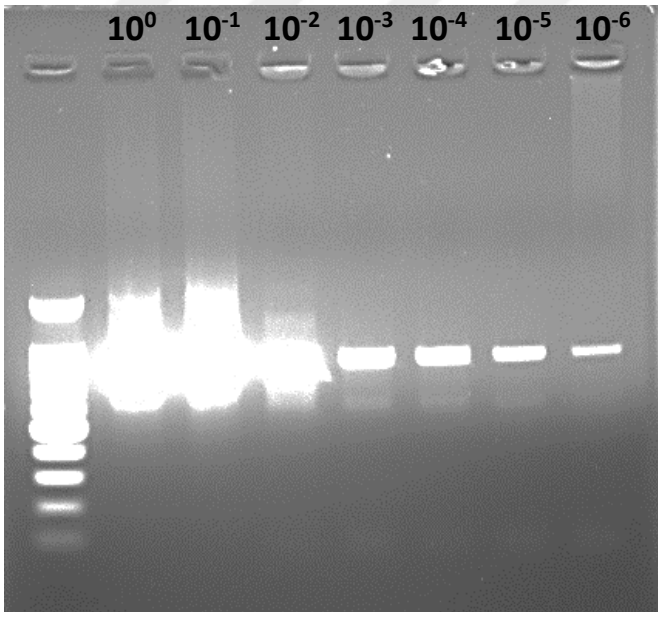
4.1. PCR Optimizasyon Bulguları

Primerlerin çoğaltacağı DNA miktarının ve PCR testinin optimizasyonu çalışmaları için kullandığımız pozitif örnek (HAdV 5) virusun hücre kültürü süspansiyonu 10 katlı sulandırılarak DNA izolasyonları gerçekleştirildi ve nanodrop ile ölçülen DNA miktarları Şekil 12'de, her bir DNA'dan yapılan PCR sonuçları da Şekil 13'de gösterilmiştir.

Report 20180502 DENİZ(Adeno) Test Type Nucleic Acid Date/time 02.05.2018 15:20 Page # 1

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
-1	Default	02.05.2018	15:16	19,83	0,397	0,184	2,15	0,75	50,00	230	0,530	0,019
-2	Default	02.05.2018	15:17	2,22	0,044	0,013	3,45	1,26	50,00	230	0,035	-0,008
-3	Default	02.05.2018	15:17	-0,35	-0,007	-0,021	0,33	-3,18	50,00	230	0,002	0,017
-4	Default	02.05.2018	15:18	-0,02	-0,000	-0,005	0,08	-0,02	50,00	230	0,024	0,020
-5	Default	02.05.2018	15:19	0,22	0,004	0,003	1,74	0,25	50,00	230	0,018	0,008
-6	Default	02.05.2018	15:19	-0,04	-0,001	-0,016	0,05	0,12	50,00	230	-0,007	0,012

Şekil 12: 10 katlı dilüe edilen virus süspansiyonlarından elde edilen DNA miktarlarının Nanodrop'taki değerleri.

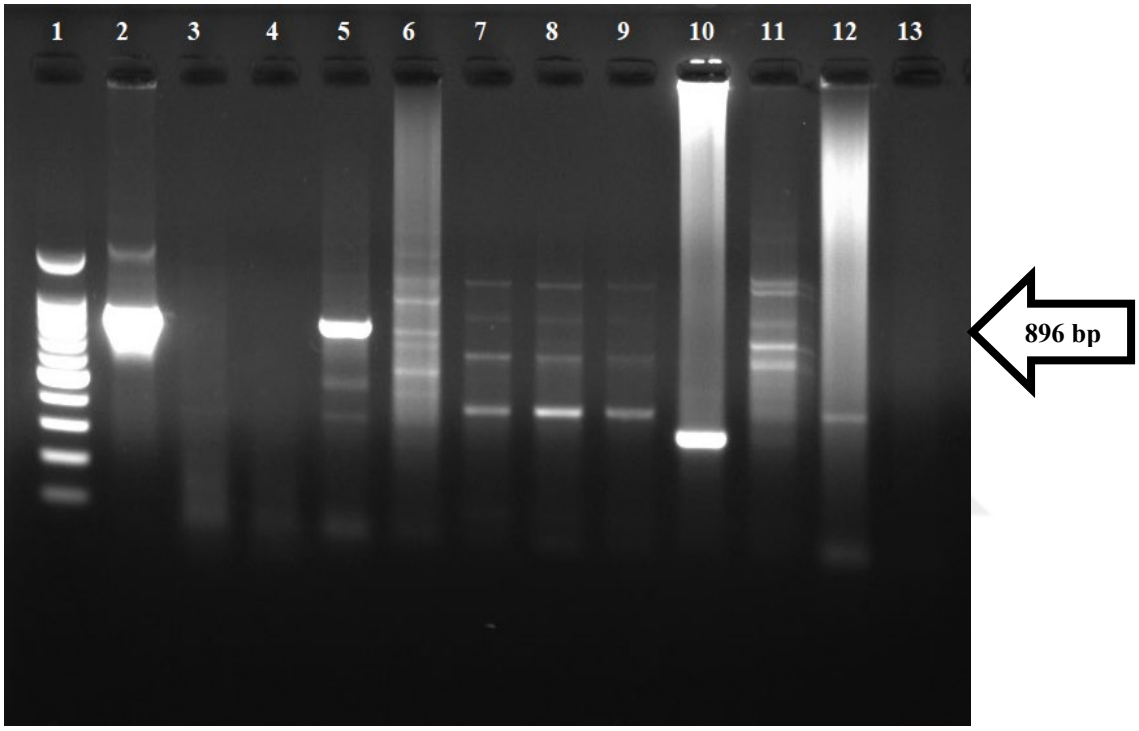


Şekil 13: 10 katlı Dilüe edilen virus süspansiyonlarından elde edilen DNA miktarlarının PCR görüntüsü

4.2. PCR Sonuçları

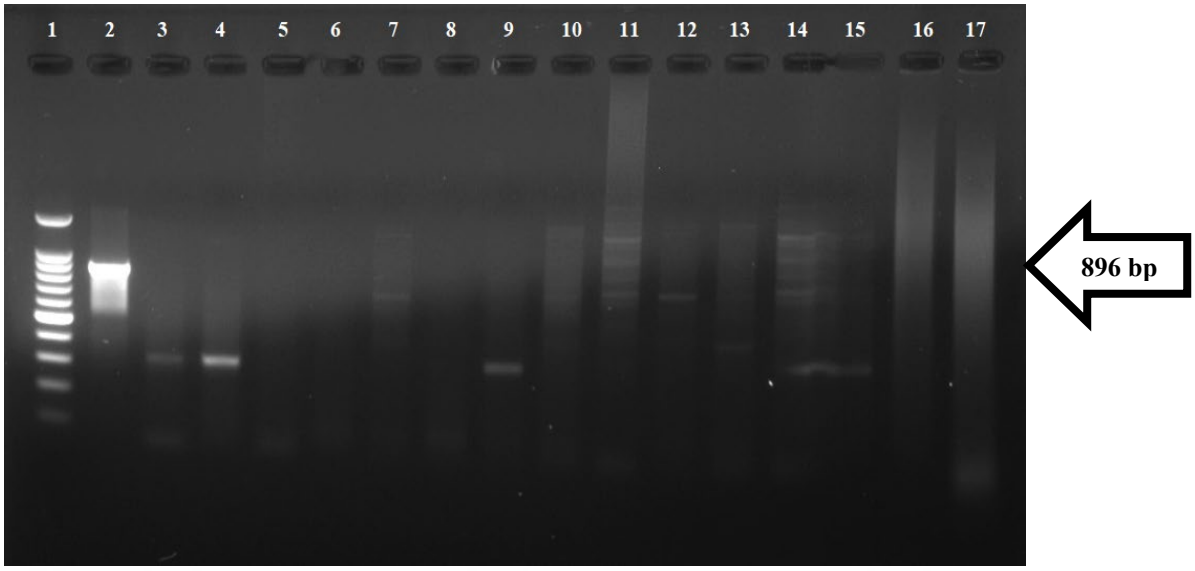
4.2.1. Tüm human adenoviruslarının (HAdV Panadenovirus) saptanmasına yönelik PCR Çalışmalarının Bulguları

Panadenovirus PCR çalışmalarında analiz edilen 100 gıda örneğinden 2 adet şinitzel örneği, 1 adet midye örneği ve 2 adet soslu kanat örneği olmak üzere toplam 5 adet örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 14, 15 ve 16).



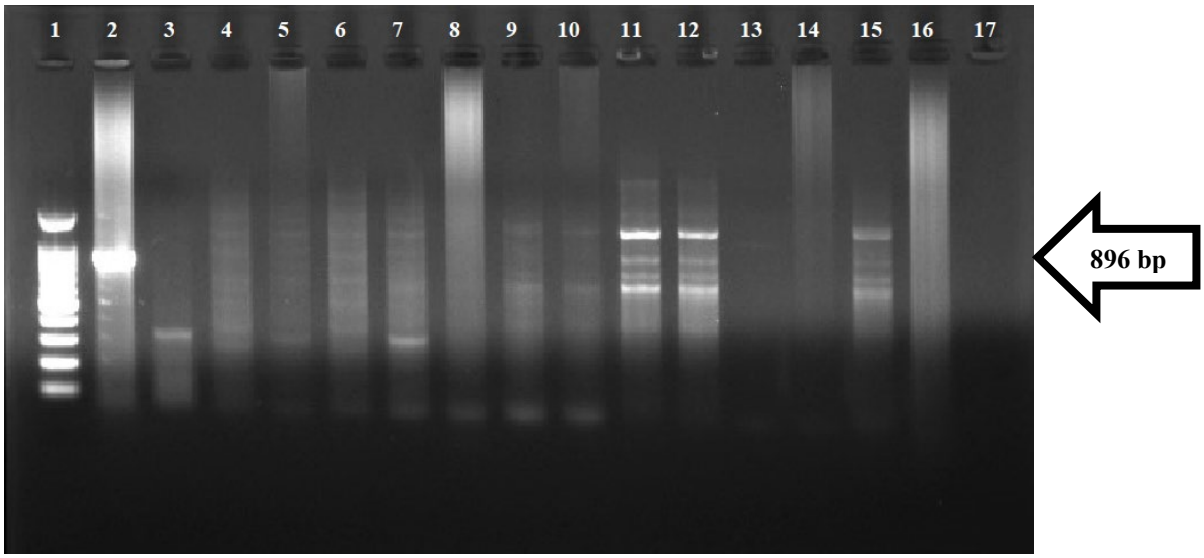
Şekil 14: Panadenovirus primerleri ile yapılan PCR sonucu. 5 no.lu kuyucukta 26 no.lu Midye Örneği 896 bp'lik bant görüntüsü.

1: Marker (100bp), 2: Pozitif Kontrol, 3: Midye, 4: Midye, 5: Midye no. 26, 6: Midye, 7: Kıyma, 8: Kıyma, 9: Kıyma, 10: Piliç Salam, 11: Jambon, 12: Şinitzel, 13: Negatif Kontrol



Şekil 15: Panadenovirus primerleri ile yapılan PCR sonucu 11 no.lu kuyucukta 12 no.lu şinitzel örneği ile, 14 no.lu kuyucukta 14 no.lu şinitzel örneğinin 896 bp'lik bant görüntüsü.

1: Marker (100 bp), 2: Pozitif Kontrol, 3: Kıyma, 4: Kıyma, 5: Sucuk, 6: Sucuk, 7: Tavuk Kanat, 8: Sucuk, 9: Tavuk Kanat, 10: Paketli Kıyma, 11: Şinitzel no. 12, 12: Paketli Kıyma, 13: Paketli Kıyma, 14: Şinitzel no. 14, 15: Piliç Salam, 16: Şinitzel, 17: Negatif Kontrol

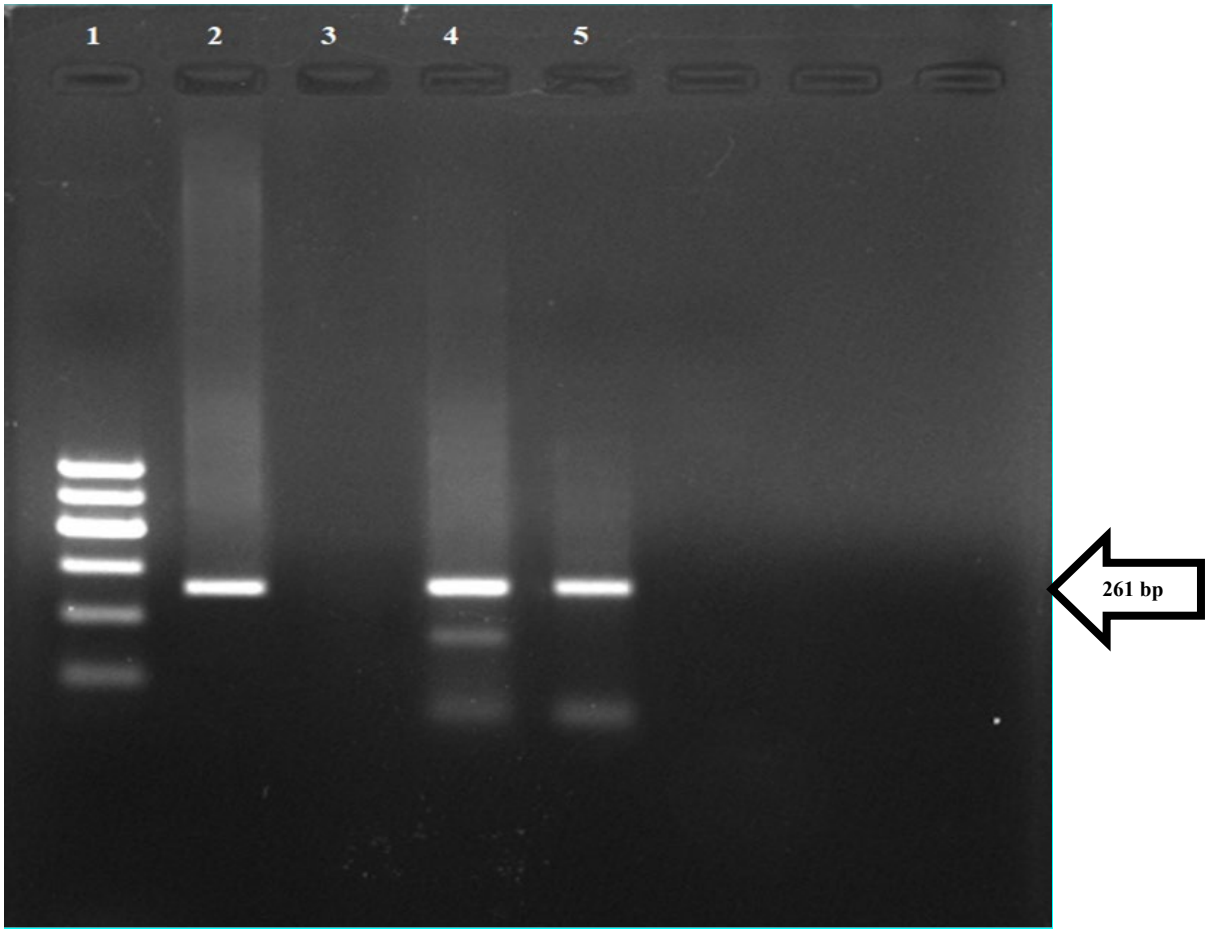


Şekil 16: Panadenovirus primerleri ile yapılan PCR sonucu 11 no.lu kuyucukta 81 no.lu soslu kanat örneği ile, 12 no.lu kuyucukta 82 no.lu soslu kanat örneğinin 896 bp'lik bant görüntüsü.

1: Marker, 2: Pozitif Kontrol, 3: Dökme Piliç, 4: Dökme Piliç, 5: Dökme Piliç, 6: Dökme Piliç, 7: Dökme Piliç, 8: Soslu Kanat, 9: Soslu Kanat, 10: Soslu Kanat, 11: Soslu Kanat 81, 12: Soslu Kanat 82, 13: Ton Balığı, 14: Ton Balığı, 15: Dana Sosis, 16: Negatif Kontrol

4.2.2. HAdV 40 ve HAdV 41 için yapılan PCR çalışmalarının bulguları

Gıda örneklerinde, HAdV 40 ve HAdV 41'in spesifik primerleri ile yapılan PCR analizlerinde yalnızca 2 adet soslu kanat örneğinin pozitif olduğu saptandı (Şekil 17).



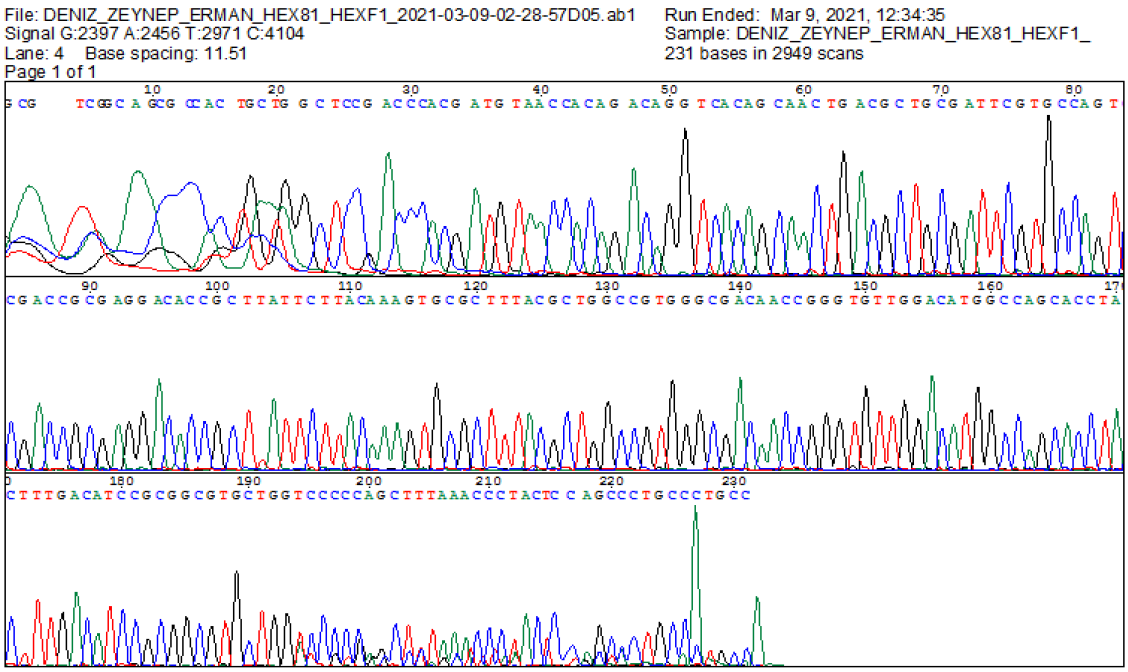
Şekil 17: 4 no.lu kuyucukta 82 no.lu soslu kanat örneği ile, 5 no.lu kuyucukta 81 no.lu soslu kanat örneğinin HAdV 40 ve HAdV 41 spesifik primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

1: Marker (100 bp), 2: Pozitif Kontrol, 3: Negatif Kontrol, 4: Soslu Kanat no.82, 5:Soslu Kanat no.81

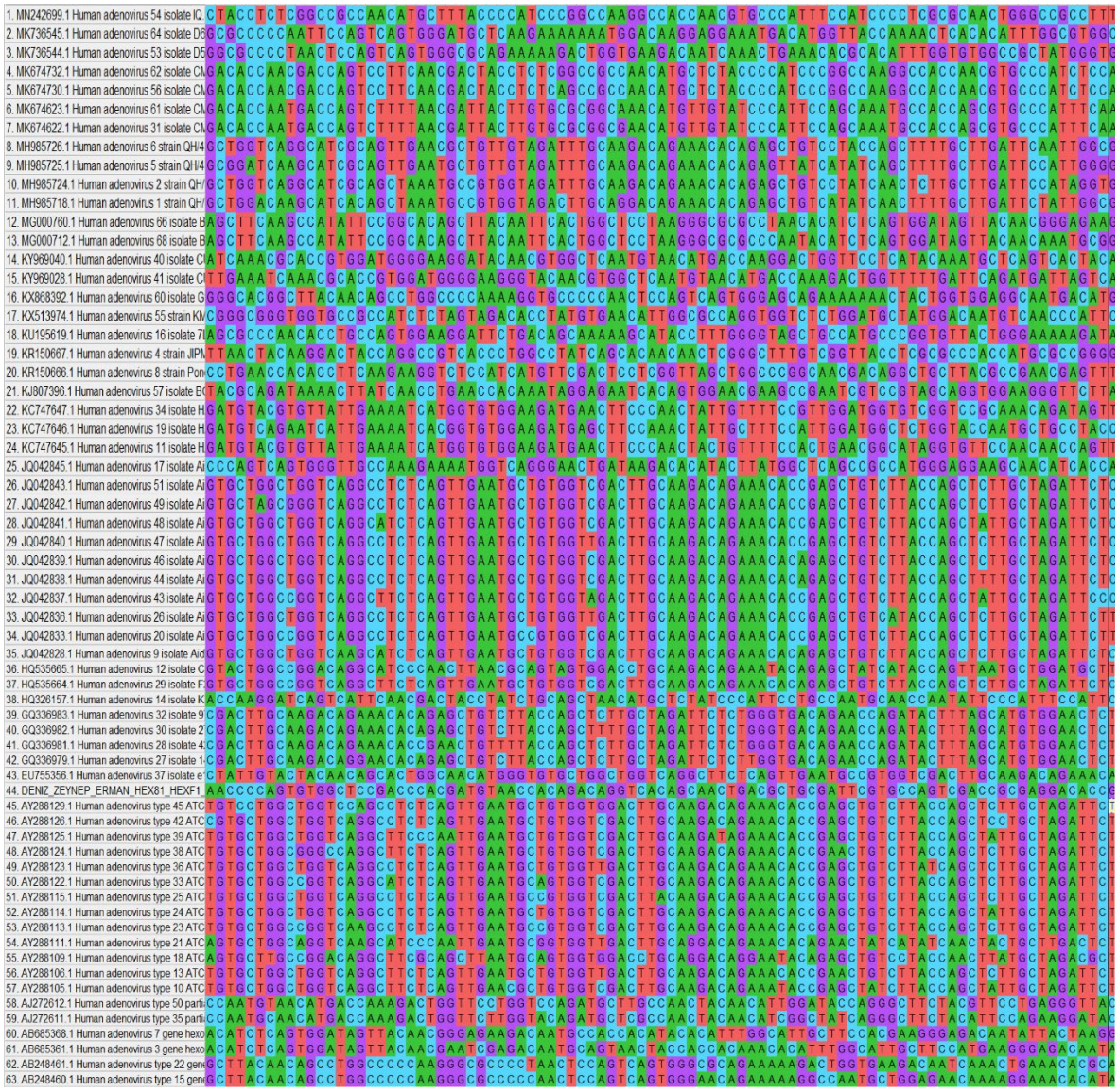
4.3. Sekans Sonuçları

HAdV 40 ve HAdV 41 yönünden pozitif olduğu tespit edilen 2 adet soslu kanat örneğinin hekzon gen bölgesi için F ve R primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin sekans sonuçlarının kromotogramları Chromas programıyla incelendi (Şekil 17). DNA diziliminin ilk başlangıç ve son bölümlerinde okunmayan veya kesin olarak karar verilemeyen nükleotidlerin olduğu bölgeler ayıklandı. Ayıklamadan sonra her iki örnekte de F ve R primerleri ile yapılan sekanslar birleştirilerek tek gen bölgesi şeklinde NCBI gen bankasında BLAST analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla toplam 62 HAdV tipinin

referans genleri NCBI gen bankasından elde edildi ve bu çalışmada elde edilen iki örneğin (örnek 81 ve 82) gen dizilimleri ile karşılaştırıldı. Daha sonra Mega X programında pozitif örneklerin sekansı ile referans sekansların filogenetik analizi için Maximum Likelihood metodu kullanıldı. Çalışmamızda elde edilen örnek 81 ve örnek 82'ya ait DNA dizilimlerinin referans genlerle yapılan alingment sonuçları Şekil 19 ve Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 18: 81 no.lu örneğin HAdV Hekzon geninin F primeri ile elde edilen kromotogram görüntüsü

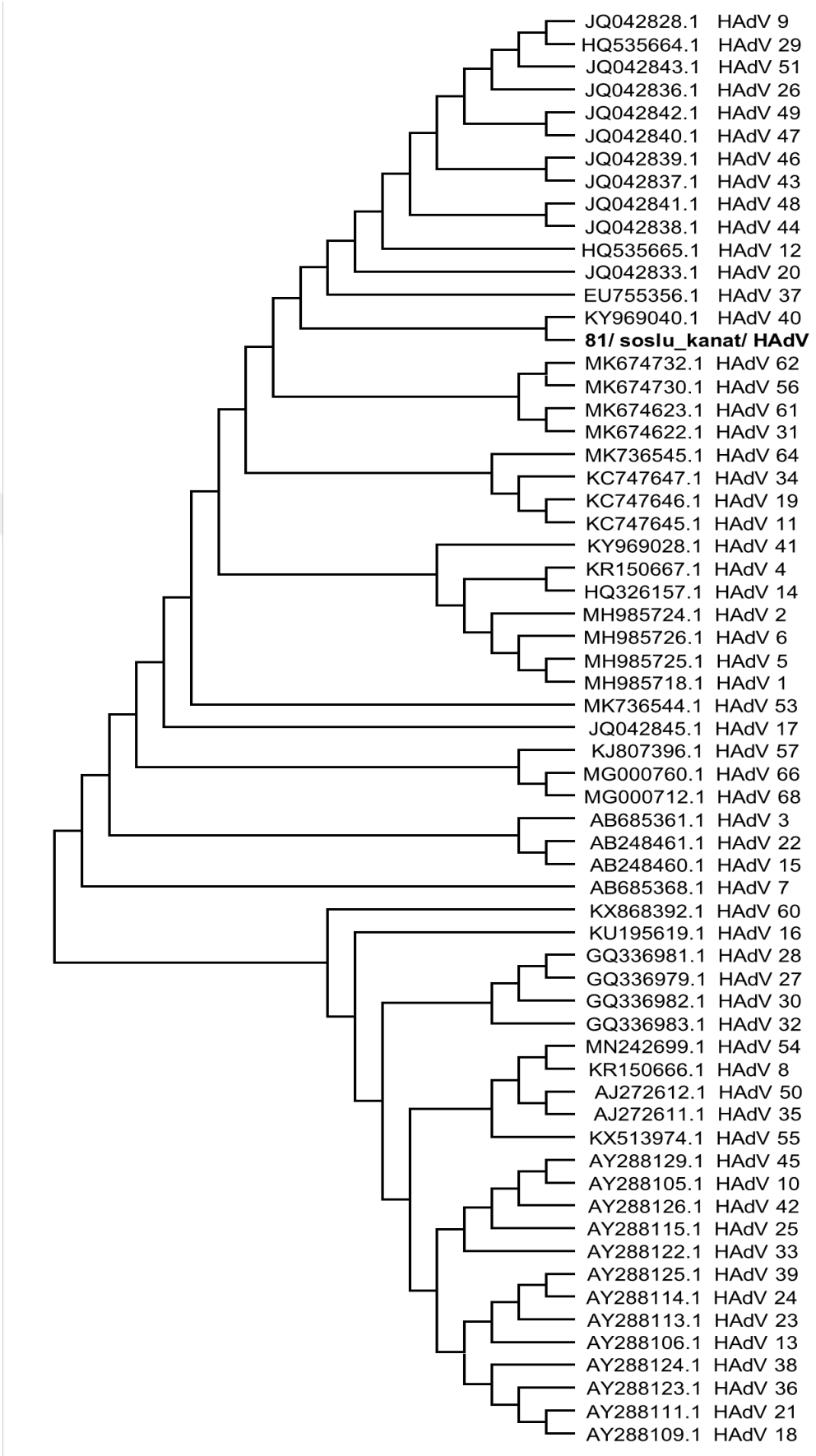


Şekil 19: 81 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu alignment görüntüsü

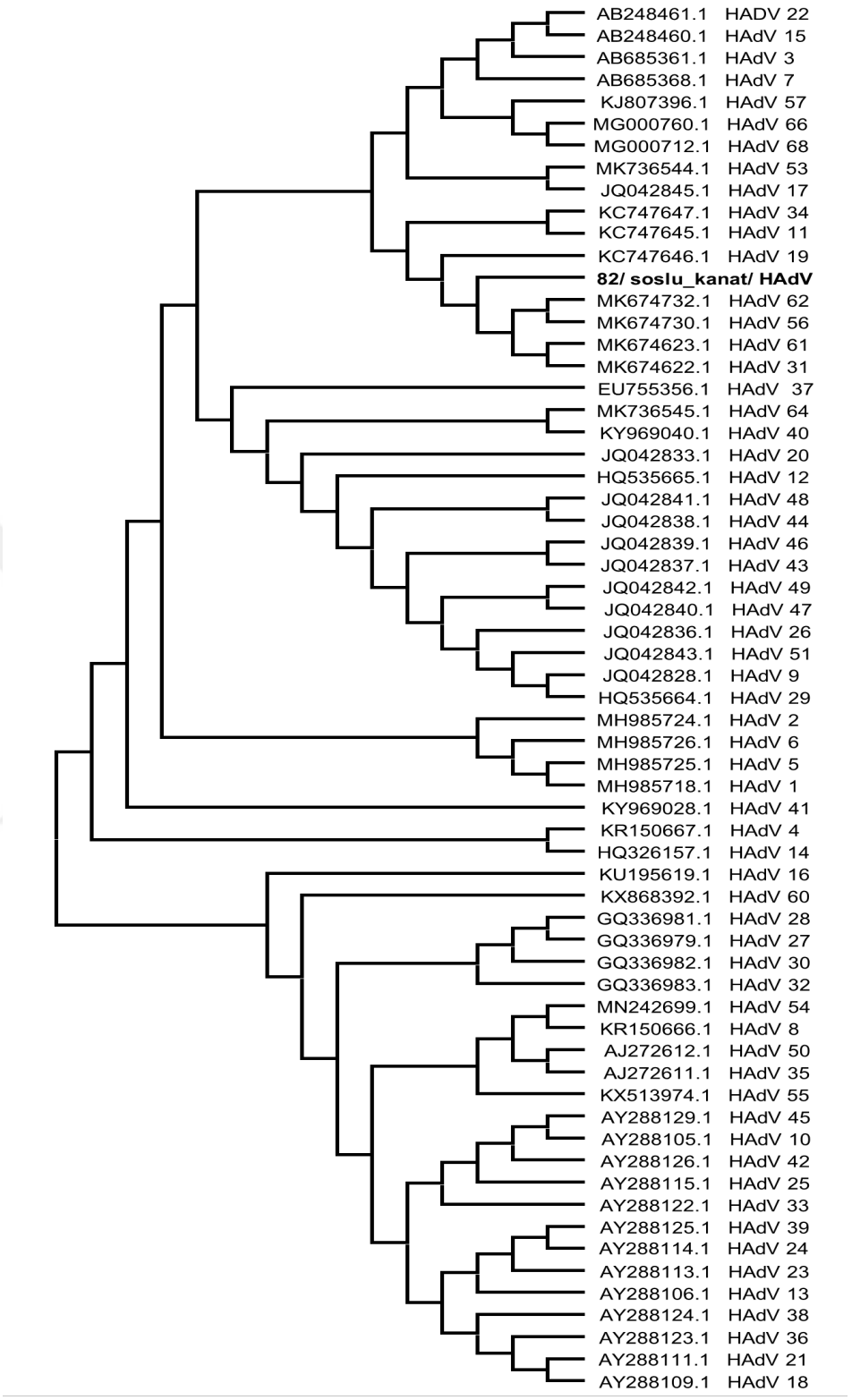


Şekil 20: 82 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu alignment görüntüsü

Mega X programında pozitif örneklerin sekansı ile referans sekansların filogenetik analizi için Maximum Likelihood metodu ile yapılan analiz sonucunda 81 numaralı soslu kanat örneğinin F grubunda yer alan HAdV 40 ile yakın benzerlik gösterdiği (Şekil 21), 82 numaralı soslu kanat örneğinin ise F grubunda yer alan HAdV 40 ve HAdV 41 ile yakın benzerlik göstermediği (Şekil 22) saptandı.



Şekil 21: 81 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu filonegetik haritası

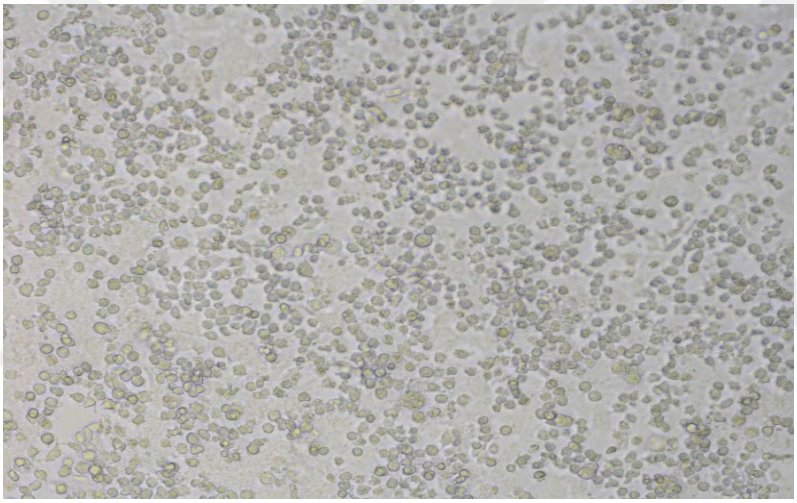


Şekil 22: 82 no.lu soslu kanat örneğinin sekans sonucu filonegetik haritası

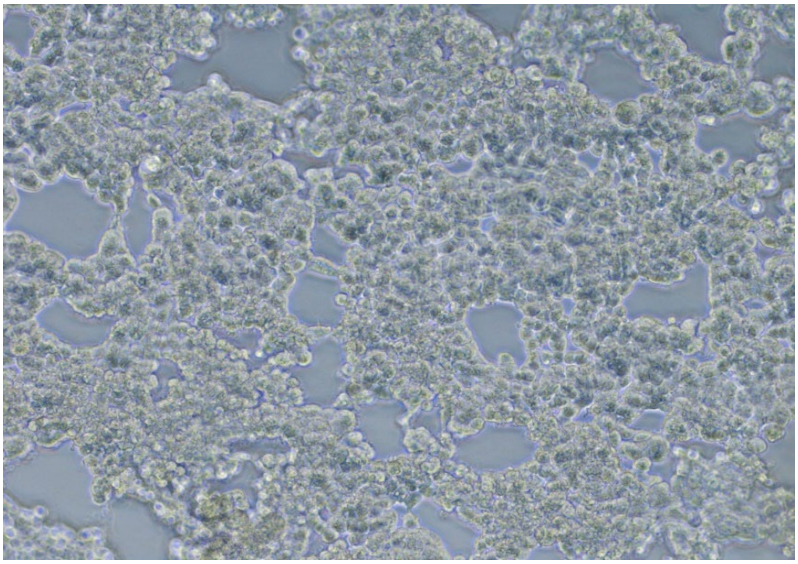
4.4. Hücre Kültürlerinde Virus İzolasyon Sonuçları

Panadenovirus PCR çalışmaları sonucunda pozitif olduğu tespit edilen 5 adet örneğin (2 soslu kanat, 2 şinitzel, 1 midye) HEp-2 hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmaları yapıldı. İlk pasajlar sonunda hiç bir örnekte HAdV üremesine bağlı herhangi bir sitopatik etki (CPE) oluşumuna rastlanmadı. Her bir örnek için toplam 5 kez kör pasaj yapıldı ve herhangi bir CPE oluşmadığı gözlendi ve pasajlar durduruldu.

HAdV 5 pozitif kontrolün (Şekil 24) HEp-2 hücre kültüründeki 3 günde oluşan CPE görüntüsünde hücrelerin parçalanmış olduğu, bir araya gelmiş ve aralarında vakuoller oluşmuş olduğu gözlendi. Negatif kontrolün (Şekil 23) hücre kültürü görüntülerinde CPE gözlenmedi.



Şekil 23: Negatif kontrol HEp-2 hücre kültürü görüntüsü (40X)

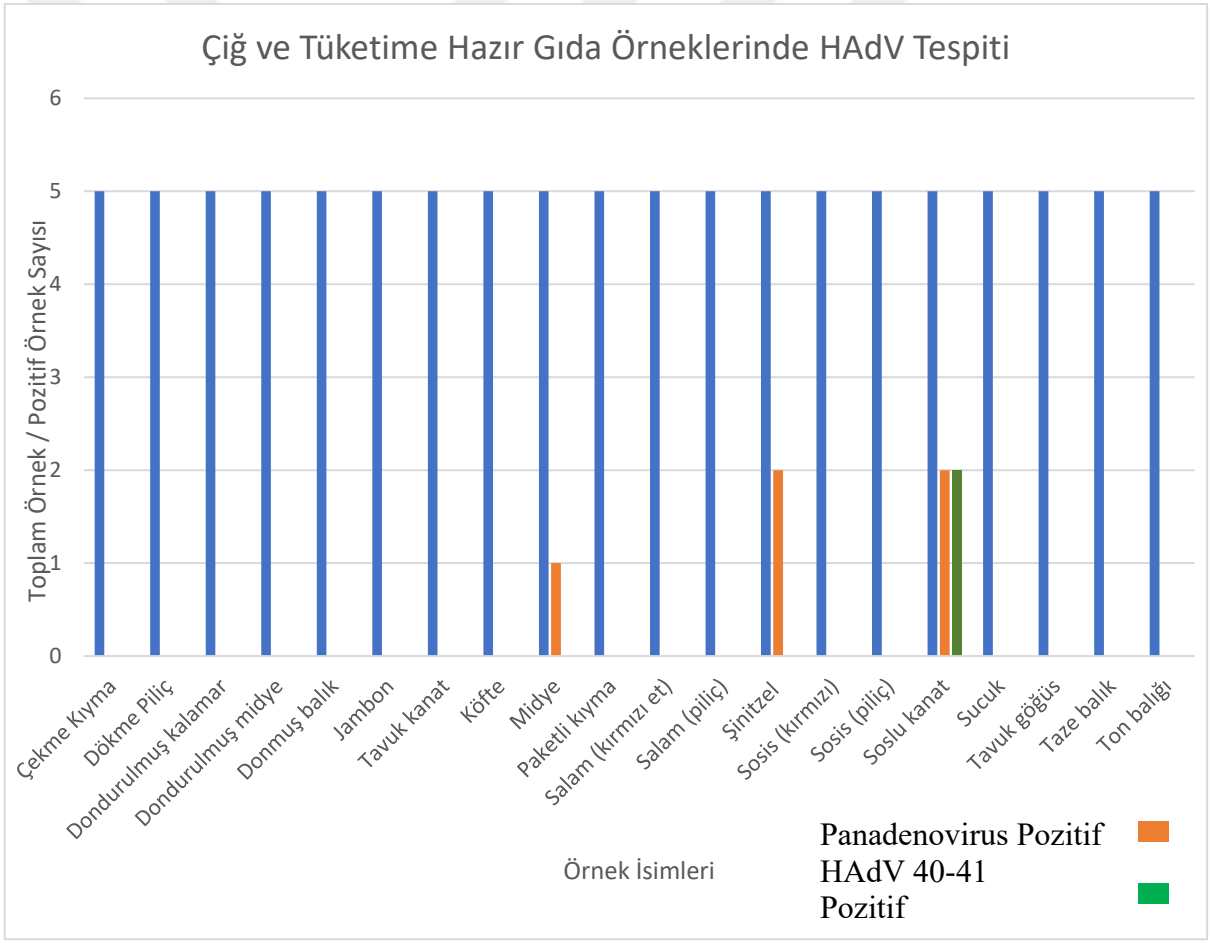


Şekil 24: HAdV 5 pozitif kontrol HEp-2 hücre kültürü görüntüsü (40X)

4.5. PCR ile Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

20 farklı gıda türünden alınan toplam 100 örnekte, HAdV yönünden yapılan incelemede 5 midye örneğinden 1 tanesi, 5 şinitzel örneğinden 2 tanesi ve 5 soslu kanat örneğinden 2 tanesi HAdV açısından PCR ile pozitif bulundu. Bunların içinden tip spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunda sadece 2 soslu kanat örneği HAdV 40 ve 41 açısından pozitif bulundu. Tüm örnekler için istatistiksel analizler One-Way ANOVA ile yapıldı. İstatistiksel analiz için her bir gıda grubu içerisindeki pozitiflik oranı dikkate alındığında sonuç anlamlı bulunmuştur ($p< 0.05$).

Tablo 12: Gıda örneklerinde HAdV pozitifliğinin istatistiksel analizi



5. TARTIŞMA

Gıda patojenlerinin kontrollerinde bakteriyel etkenlerin aranması, virusların izlenme eksikliği, gıda kaynaklı viral hastalıklar söz konusu olduğunda ülkelerin raporlamayı ihmal etmesi, gıda kaynaklı viruslar konusunda daha çok çalışma yapılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Gıdaların soframıza ulaşana kadar geçtiği aşamalarda hijyen koşullarının yetersiz olması nedeniyle gıdalar kontamine olabilmekte ve bu da insanlarda gastroenterit tablosuna neden olabilmektedir. Gastroenterit vakalarında en sık rastlanan etkenler bakteriyel patojenler olsa da viral patojenler de yaygın bir şekilde görülmektedir (Hasöksüz, 2008).

Gıda kaynaklı mikroorganizmaların oluşturduğu hastalıkların yaygınlığı dünya genelinde her geçen gün daha fazla önem arz etmektedir. Oluşan salgınlar incelendiğinde, genelde mikroorganizmaların insandan insana fekal-oral yolla bulaştığı fakat gıda maddelerinin bu bulaşmada birer fomit olarak görev yaptığı saptanmaktadır (Carter, 2005; Hasöksüz, 2008).

Yapılan çalışmalar, viral etkenlerin gıdalara bulaşmasındaki başlıca sebepler arasında kanalizasyon suları ile bulaşık yer altı sularının tarımsal faaliyetlerde kullanılması, pişirmeden tüketilen gıdaların kontamine sularla yıkanması, gıda ürünlerinin işleme, taşıma, ambalajlama, depolama, satın alma, saklama, hazırlama ve pişirme aşamalarında hijyen ve güvenlik kurallarındaki eksikliklere bağlı olarak virusla kontamine çevre veya personellerden bulaşması, midye gibi deniz ürünlerinin kontamine alanlardan toplanması olduğunu göstermektedir (Hasöksüz, 2008).

Gıda ürünleri, ilk üretim aşamasından tüketime kadar geçtiği aşamalarda virusla kontamine olabilmektedir. Bu kontaminasyonların başlıca sorumlusu enfekte çalışanlardır. Yetersiz kişisel hijyen sonucunda enfekte personel fekal-oral yolla gıdayı kontamine edebilmektedir. Koopmans ve Duizer (2004) gıda kaynaklı bir çok viral salgının, gıda ile temas eden enfekte personelden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Gıdanın ön işleme aşamasında virusun var olması durumunda, endüstriyel işlemeden sonra da gıdada rezidüel virus bulunabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle hammaddeye veya gıdanın üretildiği ortama virusun girişini önlemek için iyi tarım uygulamaları ve iyi üretim uygulamalarına, üretim aşamasında ise virusun varlığının kontrol altında tutulması için HACCP uygulamalarına önem verilmelidir.

Enfekte personelin virusu kusma yoluyla da saçtığı bildirilmiştir. Enfekte personellerin kusmuk örneklerinde elektron mikroskopuyla virus partikülleri tespit edilmiş ve bunun enfeksiyonun önemli kaynaklarından biri olduğu belirtilmiştir (Caul, 1994). Şiddetli kusmanın sonucunda virusu içeren aerosollerin gıdanın işlendiği yerlerde geniş bir alana yayıldığı ve sonucunda gıdanın kontamine olduğu tespit edilmiştir (Seymour ve Appleton, 2001).

Gıda kaynaklı hastalıkların, küresel hastalık yükünü artırdığı bilinmektedir. Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenlerin neden olduğu salgın ve hastalıkların, yalnızca hastalık yoluyla değil, aynı zamanda popülasyon üzerindeki etkileri azaltmak için alınan önlemlerle ilişkili maliyetler yoluyla da sağlık üzerinde ağır bir yük oluşturduğu bildirilmiştir (Bosch ve ark., 2018). ABD'de 2013 yılı verilerine göre gıda kaynaklı hastalıkların tahmini ekonomik yükü yıllık 55,5 milyar dolar olarak belirtilmiştir (Scharff R. L., 2015). Gıdalar soframıza ulaşana kadar toplama, işleme, taşıma, depolama, satın alma, saklama, hazırlama ve pişirme aşamalarından geçmektedir. Tüm bu aşamalarda, gıda güvenliğini sağlamak için uygulanan tüm sistemler her ne kadar gelişmiş olsa da insan hatalarına bağlı gıda kaynaklı hastalıklar hala tüm dünyada ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Gıda güvenliğinin olumsuz etkilenmesinin yanında, hastaneye yatış ve iş gücü kaybı gibi ekonomik etkileri de göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür.

Enterit tablosuna neden olan patojenler üzerine yapılan çalışmaların daha çok bakterilere yönelik olduğu görülmektedir. Viral etkenlerin araştırıldığı çalışmalarda ise sıklıkla karşımıza çıkan etkenler arasında noroviruslar, hepatit A ve E virusları, HAdV'lar ve rotaviruslar bulunmaktadır (Diez Valcarce ve ark., 2012; Banyai ve ark. 2018; Koopmans, 2012; O'Shea ve ark. 2019). HAdV'lar sindirim sistemi enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonları gibi bir dizi hastalıkla ilişkili olmakla beraber özellikle HAdV 40 ve HAdV 41 çocukluk çağı gastroenteritinin nedeni olarak Rotavirusun ardından ikinci sırada yer almaktadır (Crabtree ve ark., 1997; Mickan ve Kok, 1994; Gülen ve Hacımustafaoğlu, 2013). Bu çalışmada HAdV 40 açısından pozitif bulduğumuz soslu kanat örneklerinin genellikle 5 yaş altı çocuklar tarafından tüketilmemesine karşın, ebeveynler tarafından tüketildiğinde HAdV'a bağlı enfeksiyonunun ortaya çıkması sonucu evdeki küçük yaştaki çocukların da risk altında olabileceğini düşünmekteyiz.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, Arjantin ve Uruguay'dan ithal edilen işlenmiş (sosis, sucuk, salam, jambon, et ezmesi) ve işlenmemiş (sığır, domuz, tavuk ve vahşi

hayvan eti) et ürünlerinden oluşan numuneler incelenmiş ve 117 adet işlenmemiş et ürününün 17'sinde hepatit A virusu, 25'inde ise rotavirus tespit edilmiş. 42 adet işlenmiş et ürünü numunesinin ise 12'sinde hepatit A virusu, 13'ünde rotavirus tespit edildiği bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2018). İstanbul'da yapılan bir çalışmada ise tüketime hazır gıda örneği olarak domates, maydonoz, taze soğan, karışık salata, marul ve bulgur köftesinden oluşan toplam 525 adet örnek norovirus varlığı yönünden incelenmiş ve 1 taze soğan ile 1 domates örneğinde norovirus GII tespit edildiği bildirilmiştir (Yılmaz A. ve ark., 2011). Avrupa'da, enterik HAdV'ların gastroenterite sebep olduğu içme suyu kaynaklı 3 salgın bildirilmiştir (Divizia ve ark., 2004; Kukkula ve ark. 1997; Villena ve ark., 2003). Avrupa'da yapılan bir başka çalışmada 6 ülkede ırmak, göl, deniz ve rezervuarlardan alınan su örneklerinde enterik viruslar aranmış ve HAdV 41 ile Mammalian Orthoreovirus içerdikleri tespit edilmiştir. Yalnızca 1 örnekte hiç bir enterik virusa rastlanmamıştır (D'Ugo ve ark., 2016). Güney Kore'de, Cheong ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada sebzelerde enterik virusların varlığı aranmış ve bu amaçla çeşitli çiftliklerden 30 adet sebze örneği, 29 adet de yeraltı suyu örneği toplanmıştır. Yer altı sularının %17'sinde ve sebze örneklerinin ise %10'unda enterik viruslara rastlandığı, bu virusların içerisinde en çok görülenin ise HAdV olduğu bildirilmiştir. Ghalyaun ve Alçay (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, İstanbul'un farklı bölgelerinden toplanan midye ve karides örnekleri HAdV, astrovirus ve rotavirus yönünden incelenmiş, karides örneklerinin hiçbirinde incelenen viruslara rastlanmadığı bildirilmiştir. Ancak toplanan 1350 adet midye örneğinin % 46.15'inin HAdV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir (Ghalyoun F. ve Alçay A.Ü., 2018). Gıdalar üzerinde virusların tespitine yönelik çalışmalar incelendiğinde, çoğunlukla kabuklu deniz ürünlerinde viral etkenlerin aranmasına yönelik olduğu, diğer hayvansal gıda örneklerinde viral etkenin tespitine yönelik araştırmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada deniz ürünleri dışındaki hayvansal gıda örneklerinde de (kırmızı et ve tüketime hazır et ürünleri, beyaz et ve tüketime hazır beyaz et ürünleri) HAdV'ların saptanmasına yönelik incelemeleri ve özellikle gastroenterit vakalarından sorumlu HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin varlığına ve yaygınlığına yönelik incelemeleri içermektedir. Yaptığımız literatür incelemelerinde deniz ürünleri dışındaki hayvansal gıda örneklerinde HAdV'ların varlığına yönelik araştırmaların çok sınırlı olduğu görülmüş ve HAdV 40 ve HAdV 41'e yönelik araştırmalara rastlanılmamıştır.

Dünyada HAdV'ların neden olduğu gastroenterit vakaları ile ilgili çalışmalar incelendiğinde vakaların çoğunun küçük yaştaki çocuklardan oluştuğu, etken tiplendirmesinin yapıldığı durumlarda ağırlıkla HAdV 40 ile HAdV 41'in karşımıza çıktığı ve enfeksiyon ile mevsim arasında ilişki üzerine farklı görüşlerin bildirildiği görülmektedir. Houstan, Teksas'da 1986 yılı Haziran ayı ile 1991 yılı Nisan ayını kapsayan bir çalışmada bu tarihler arasında çıkan salgınlarda, 249 çocuktan 94 tanesinde enterik HAdV tespit edilmiştir (Van ve ark., 1992). Japonya'da Maizuru şehrinde akut gastroenterit vakalarının görüldüğü bir salgında, HAdV 1, 2, 3, 5 ve 41 tipleri tespit edilmiştir (Shimizu ve ark., 2007). İran'ın Tahran ilinde yapılan bir çalışmada, akut gastroenterit şikayeti bulunan 5 yaşından küçük 1052 çocuktan alından dışkı numunelerinin analizi sonucu, 27'sinde HAdV 40 ve 41 tiplerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Modarres ve Jam-Afzon, 2006). Wiegering ve arkadaşlarının (2011) Almanya'da yaptığı bir çalışmada 650 hastanın 58'inde (%9.7) HAdV pozitifliği saptanmıştır. Japonya'da Nakanishi ve arkadaşlarının (2009) viral enterik ajanları saptamak üzere yaptıkları çalışmada HAdV pozitifliği %4,8 olarak bildirilmiştir. Çin'de Zhang ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada hastaneye yatışı gerçekleşen 5 yaşından küçük 201 çocuğun dışkı örneklerini incelediklerinde %5 oranında HAdV pozitifliği bulmuşlardır. Avustralya'da 1981-1992 yılları arasında 4473 dışkı örneğinin analizini kapsayan çalışmalar, hastaneye başvuran gastroenterit vakalarının yaklaşık %3'üne HAdV'ların dahil olduğunu göstermektedir. Vakaların çoğunun küçük çocuklarla ilişkili olduğu ve HAdV 41 (%40-80) ve daha az ölçüde HAdV 40 (% 0'den az) içerdiğini göstermiştir. Virus genotiplerinin mevsimsel kalıpları belirgin olup HAdV 41'in sonbaharın sonlarında yaygın olduğu ve HAdV 40'ın ise yıl boyunca yaygın olduğu görülmüştür (Grimwood ve ark., 1995; Palombo and Bishop 1996).

Türkiye'de ise; yapılan bir çalışmada akut gastroenterit ön tanısıyla hastaneye başvuran hastalardan alınan dışkı örneklerinde HAdV pozitifliğinin en yüksek olarak 0-2 yaş arası çocuklarda tespit edildiği ve özellikle bahar aylarında HAdV enfeksiyonlarinin arttığı saptanmıştır (Varışlı ve ark. 2019). Kahramanmaraş'ta 1 Nisan 2018-31 Mart 2019 tarihleri arasında akut gastroenterit tanısı konulan hastalardan alınmış olan dışkı numuneleri retrospektif incelenmiş ve 2737 dışkı numunesinin 91 tanesinde HAdV tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı araştırmada, HAdV pozitifliğinin yaş grupları ile arasında anlamlı bir ilişki olduğu ancak mevsimsel dağılım ile arasında anlamlı bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir (Kirişçi ve Muratdağı, 2019). Bir başka retrospektif çalışma

da Elazığ ilinde yapılmıştır, 1 Aralık 2015 ile 30 Kasım 2017 alınan ile tarihleri arasında gastroenterit şüphesi bulunan vakalardan çeşitli poliklinik ve servislerde alınan dışkı örnekleri laboratuvarda incelenmiş ve 6618 örnekten 170 tanesi HAdV açısından pozitif bulunmuş ve yaz aylarında daha çok görüldüğü bildirilmiştir (Aytaç ve ark., 2020). Sivas ilinde yapılan retrospektif bir çalışmada, ishal şikayeti bulunan vakalardan alınan 2988 adet dışkı örneğinin incelemesinde, 1082 örnekte viral antijen tespit edilmiş, viral antijen tespit edilen örneklerin 307 tanesinin HAdV açısından pozitif olduğu bildirilmiştir (Karagün ve ark., 2014). Ece ve arkadaşları (2012) İzmir ilinde 112 dışkı örneğinde HAdV ve rotavirus varlığını araştırmış, %1.2 oranında HAdV pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir

HAdV'a bağlı gastroentestinal vakalarının mevsimsel etkisi ve hasta yaş grupları arasındaki ilişki konusunda araştırıcılar çok farklı görüşler ileri sürmektedirler. İsviçre'de 1998-2017 yılları arasında HAdV pozitif vakaların belirli bir mevsimsel dağılımı olmadığı belirtilmiştir (Akello, 2020). Varışlı ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışma sonucunda HAdV enfeksiyonlarının özellikle bahar aylarında arttığını göstermiştir. Özdemir ve arkadaşları. (2010) ise yaptıkları çalışma sonucunda HAdV pozitif vaka sayısının sonbahar ve kış aylarında artışa geçtiğini göstermiştir. Ancak Kirişçi ve Muratdağı (2019) yaptıkları bir çalışmada, HAdV pozitifliğinin mevsimsel dağılım ile arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirtmiştir. Aynı çalışmanın bulgularına dayanarak, HAdV pozitifliğinin yaş grupları ile arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Çalışmanın bulguları 2-6 yaş grubunda HAdV pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu göstermiştir ($p<0.002$). Varışlı ve arkadaşları (2019) gastroenterit tablosunda HAdV pozitifliğinin en yüksek olarak 0-2 yaş arası çocuklarda tespit edildiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise Modarres ve Jam-Afzon (2006) HAdV enfeksiyonlarının en çok 6-12 aylık çocuklarda görüldüğünü saptamıştır ve aynı zamanda mevsimsel dağılım ile HAdV pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Çalışma sonucuna göre yaş ve HAdV enfeksiyonları arasındaki ilişki ($p< 0.001$) ve mevsim ile HAdV enfeksiyonları (HAdV 40 ve HAdV 41) arasındaki ilişki ($p=0.005$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada HAdV 40 açısından pozitif olarak saptanan soslu kanat örneğinin Ağustos ayında alınmasına karşın, gerek örnek sayısının gerekse pozitiflik sayısının çok yüksek olmaması, yaz aylarında HAdV'a bağlı enfeksiyonların daha çok görülme düşüncesini kesin olarak desteklememektedir. Benzer şekilde, kış aylarında daha fazla enfeksiyonun görüldüğünü ileri süren

araştırmacıların görüşüne karşın, yaz aylarında gıda kaynaklı enfeksiyonların özellikle bakteriler ve bakteriyel toksinler tarafından ortaya çıkmasının, olası viral kontaminasyonun baskılanmasına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan, enfeksiyonun küçük yaşta ortaya çıkmasının bağışıklık sisteminin yeterince gelişmemesine bağlı olduğu düşünülebilir.

Dünya'da yapılmış olan araştırmalar, gıda kaynaklı viral salgınların sadece gelişmekte olan ülkelerin değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerin de sorunu olduğunu ortaya koymaktadır. Salgınların ve gastroenterit olgularının etiyolojisinde HAdV'ların payı da göz ardı edilmemelidir.

HAdV enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisi, virus izolasyonu, antijen tespiti veya PCR testi ile gerçekleştirilebilir. Tipe özgü tanımlama, serum nötralizasyonu ve/veya hemaglütinasyon inhibisyonu testi ile gerçekleştirilir. Serum nötralizasyonu tarafından tanınan HAdV'ların tipe özgü belirleyicileri öncelikle hekzon kapsomerinin yüzeyinde bulunur, ancak belirleyiciler ayrıca fiberde ve daha az ölçüde penton proteinlerinde de bulunur. Antijenik alanlar, hekzon proteininin L1 ve L2 halkalarına eşlenmiştir ve hatalı bir rekombinasyon sürecinden kaynaklanan 7 hiper değişken bölge, HVR1-6 (L1) ve HVR7 (L2) olarak sınıflandırılmıştır. Bu bölgelerin, hekzon serum nötralizasyon tipine özgü belirleyicilerin %99'dan fazlasını oluşturduğu ve bu nedenle moleküler tiplendirme için uygun bir bölge olduğu öne sürülmüştür (Lu ve Erdman, 2006).

Gıda viruslarının moleküler tanısında son zamanlarda viral kopya sayısı nedeniyle real-time PCR kullanılmaktadır. Fakat tez çalışmamızın planlandığı dönemde laboratuvarımız imkanları nedeniyle klasik PCR yöntemi ile planlama yapılmıştır. Bu çalışmada HAdV 40 ve HAdV 41'in tespiti amacıyla hekzon gen bölgesi PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Hekzon gen bölgesinin amplifikasyonu için panadenovirus çalışmasında F primerleri 5'-TICTTTGACATICGIGGIGTICTIGA-3' ve R primerleri 3'-TGTGGAARCAGGCIGTIGACAG-5' (Lu ve Erdman, 2006) kullanılmıştır. HAdV 40 ve 41 tespitinde ise F primerleri 5'-TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC-3' ve R primerleri 5'-ACTTAATGCTGACACGGGCAC-3' kullanılmıştır (Dey ve ark., 2011).

Bu çalışmada kıyma, paketli kıyma, paketli köfte, sucuk, salam, sosis içeren işlenmiş ve işlenmemiş kırmızı et orijinli 30 adet gıda ürünü HAdV 40 ve HAdV 41 yönünden incelenmiştir. İncelenen kırmızı et ürünlerinde HAdV 40 ve HAdV 41 varlığına ilişkin bir bulgu tespit edilmemiştir. Çalışmamızda ikinci grup örnekleri olarak tavuk

kanat, göğüs eti, dökme piliç, soslu kanat, şinitzel, jambon, sosis ve salam içeren işlenmiş ve işlenmemiş toplam 40 adet beyaz et orijinli gıda örneği HAdV 40 ve HAdV 41 yönünden incelenmiştir. Bu örnekler arasında 2 şinitzel örneği Panadenovirus PCR çalışmasında pozitif sonuç vermiş ancak HAdV 40 ve HAdV 41'e spesifik primerlerin kullanıldığı PCR çalışmasında negatif sonuç vermiştir. Aynı grupta yer alan 2 soslu kanat örneği ise hem Panadenovirus PCR çalışmasında hem de HAdV 40 ve HAdV 41'e spesifik primerlerin kullanıldığı PCR çalışmasında pozitif sonuç vermiştir. Çalışmamızın üçüncü grup örneklerini ise deniz ürünleri oluşturmuştur. Süper market ve balık pazarlarından alınan balık, midye, dondurulmuş balık, dondurulmuş midye, dondurulmuş kalamar ve ton balığı olmak üzere toplam 30 adet deniz ürünü incelenmiştir. Bu örnekler içerisinde sadece 1 adet midye örneği panadenovirus PCR çalışmasında pozitif sonuç vermiş ancak HAdV 40 ve HAdV 41'e spesifik primerlerin kullanıldığı PCR çalışmasında negatif sonuç vermiştir.

Farklı gıda işletmelerinden toplanan 81 ve 82 no.lu soslu kanat örneklerinin HAdV tiplerin belirlenmesi için önerilen spesifik primerler ile yapılan PCR testi sonucunda, 81 no.lu örneğin jel görüntüsünde 261bp'lik tek bir bant, 82 no.lu örneğin jel görüntüsünde ise 261 bp.'lik bantın yanısıra hafifte olsa ikinci bir bant daha görülmektedir. Ardından gerçekleştirilen DNA dizilimi sonucunda ise; tek bant oluşturan 81 no.lu örneğin HAdV 40'a yakın benzerlik gösterdiği (Şekil 21), ancak 82 no.lu örneğin HAdV 40 ve HAdV 41 ile yakın benzerlik göstermediği saptandı (Şekil 22). Bu iki örnekten 82 numaralı soslu kanat örneğinin sekans analiz çalışmaları sonucunda HAdV 40 ve 41 ile yakın benzerlik göstermemesi, tip spesifik primerler ile yapılan PCR analizleri ile kesin kanıya varılamayacağını ve bu nedenle sekans yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Söz konusu gıda kaynaklı hastalıklar olduğunda, akla ilk önce bakteriyel etkenler gelmektedir. Fakat hem dünyada hem de Türkiye'de yapılan çalışmalar (Hasöksüz, 2008) ve bildirilen vakalar, viral etkenlerin de göz ardı edilemeyecek kadar yaygın olduğunu göstermektedir (Scallan ve ark., 2011). Viral etkenlerin araştırılmasında her ne kadar hepatit A virusu üzerine yoğunlaşılmış olsa da, salgınlardan sorumlu viral etkenler arasında rotavirus, norovirus ve HAdV'ların da yer aldığı görülmektedir. İnsan kaynaklı kontaminasyonların önüne geçilebilmesi için, çalışanların semptom gösterdikleri süre boyunca çalıştırılmaması gerekmektedir ve sonrasında da etkeni saçabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, personelin gıda yoluyla bulaşan etkenler ve kişisel hijyen

konusunda düzenli eğitimlere tabi tutulması uygun olacaktır. Dolayısıyla kontaminasyonun önlenmesi, mücadele yöntemlerinin önemli adımlarından biridir. Gıda işletmelerinin uyması gereken HACCP usulleri kanunen tanımlanmıştır ancak uygulamanın sıklaştırılması için tedbirlere ihtiyaç olduğu görülmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklarda zaman içerisinde virusların öneminin artması sebebiyle, mevzuatların ve izleme faaliyetlerinin de bu doğrultuda gelişmesi beklenmektedir. Yapılan araştırmalar çoğunlukla bakteriyel etkenlere odaklanmakta, bu da olası viral etkenlerin tespit edilememesine neden olmaktadır.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 2011 yılında yayınladığı Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, gıdaların mikrobiyolojik kriterleri ile gıda işletmecilerinin uyması gereken kuralları belirlemeyi amaçlamıştır ancak Gıda Güvenirliliği Kriterleri içerisinde viral etkenler açısından kontrol tanımlanmamıştır (Resmi Gazete, 2011b). Aynı yıl yayınlanan Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği ise, yalnızca canlı çift kabuklu yumuşakçalar için sağlık standartları kapsamında viral etkenlerin test usullerine değinmiştir (Resmi Gazete, 2011a). Gıda kaynaklı hastalıklarda zaman içerisinde virusların öneminin artması sebebiyle mevzuatların ve izleme faaliyetlerinin de bu doğrultuda gelişmesi beklenmektedir.

Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalar ve bu çalışmanın bulguları, virusların neden olduğu gastroenterit vakalarında kontaminasyona daha dikkat çok edilmesi gerektiğini göstermektedir. HAdV'lar için onaylı bir tedavi protokolünün ve aşının olmaması sebebiyle, enterik HAdV enfeksiyonlarından korunmanın en önemli adımlarından biri olan kontaminasyonun önlenmesi hedeflenmelidir. HAdV'a bağlı gastroenterit enfeksiyonlarının gıda kaynaklı olma ihtimali göz önüne alındığında gıda işleme, hazırlama ve pişirme aşamalarında hijyenik tedbirlerin artırılması, gıdanın korunması ve dolayısıyla insanların enfeksiyondan korunması için en önemli adımlardan biridir. Bu amaçla gıda üretim zincirinin herhangi bir aşamasında yer alan tüm işletmeler için zorunlu olan HACCP ve ISO 22000 standartlarının etkili bir şekilde uygulanması gerekmektedir.

Gıda güvenliği için işletmelerde uygulanan bir dizi tedbirlerin dışında, evlerde gıda hijyeni tedbirleri bu tip enfeksiyonların önlenmesi için önemlidir. Örneğin, etkenin

sebzelerden bulaşması ihtimaline karşın iyice yıkanması, etden bulaşması ihtimaline karşın ise yeterince pişirilmesi bulaşmanın önüne geçmek için önemli bir adımdır.

Öneriler:

1- Tarım faaliyetlerinde kullanılan yer altı sularının kanalizasyon suları ile kontamine olmasını önleyici adımlar atılmalıdır.

2- Gıdayı işleyen personel için belirlenen hijyen kurallarının doğru şekilde uygulanıp uygulanmadığı kontrol edilmeli, gerektiği noktalarda düzeltici ve önleyici faaliyetler uygulanmalıdır.

3- Hayvansal gıdaların iyi pişirilmesi konusunda kamunun bilinçlendirilmesi sağlanmalıdır.

4- Gıdalarda viral patojenlerin kabul limitlerine yönelik mevzuatların geliştirilmesi gerekmektedir.

5- HAdV 40 ve HAdV 41 tiplerinin moleküler tanısı için önerilen spesifik primerlerin seçimine dikkat edilmeli ve sonuçları pozitif olan PCR ürünlerinin DNA dizilimi ile teyit edilmesi gerekmektedir.

6- Çocukların gastroenterit vakalarında saptanan HAdV tipleri düzenli olarak takip edilmelidir. Firmalar tarafından üretilen ve ticari olarak satılan HAdV 40 ve HAdV 41 antijenleri kullanılarak, hızlı tanı sistemleri geliştirilebilir ve gastroenterit vakalarında HAdV 40 ve HAdV 41 varlığının tespiti kısa sürede yapılabilir.

KAYNAKLAR

Afrad, M. H., Avzun, T., Haque, J., Haque, W., Hossain, M. E., Rahman, A. R. ve ark. (2018). Detection of enteric and non-enteric adenoviruses in gastroenteritis patients, Bangladesh, 2012-2015. *Journal of Medical Virology, 90(4),* 677-684.

Ageeva, M. R. ve Yatsyshina, S. B. (2019). Underestimated infection - on the question of the human adenovirus pathogenicity factors. *Voprosy Virusologii, 64(2),* 53-62.

Akello, J. O., Kamgang, R., Barbani, M. T., Suter-Riniker, F., Leib, S. L., Ramette, A. (2020). Epidemiology of human adenoviruses: A 20-year retrospective observational study in hospitalized patients in Bern, Switzerland. *Clinical Epidemiology,12,* 353-366.

Alsaleh, A. N., Grimwood, K., Sloots, T. P., Whiley, D. M. (2014). A retrospective performance evaluation of an adenovirus real-time PCR assay. *Journal of Medical Virology, 86 (5),* 795 – 801.

Altındis, M., Kucukkurt, S., Kalayci, R., Aslan, F., Bukulmez, A., Yoldas, Y. (2016). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus, enterik adenovirus ve norovirus sıklığı. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(1),* 1-12.

Aytac, O., Senol, F. F., Oner, P., Erkmen, N., Aslan, R., Dogukan ve ark. (2020). Akut gastroenteritli hastalarda rotavirus ve adenovirus sıklığı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 77(2),* 179-184

Bachofen, C. (2018). Selected viruses detected on and in our food. *Current Clinical Microbiology Reports, 5(2),* 143–153.

Benevento, M., Di Palma, S., Snijder, J., Moyer, C. L., Reddy, V. S., Nemerow, G.R. ve ark. (2014). Adenovirus Composition, Proteolysis, and Disassembly Studied by In-depth Qualitative and Quantitative Proteomics. *The Journal of Biological Chemistry, 289(16),* 11421–11430.

Berk, A. J. (2013). *Adenoviridae*. İçinde: Knipe, D. M., Howley, P. M., Cohen, J. I., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A. ve ark. (Eds). *Fields Virology 6th Edition.* Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, 1704 - 1732.

Biggs, H. M., Lu, X., Dettinger, L., Sakthivel, S., Watson, J. T. ve Boktor, S. W. (2018). Adenovirus associated influenza-like illness among college students, Pennsylvania, USA. *Emerging Infectious Disease, 24(11),* 2117-2119.

Borkenhagen, L. K., Fieldhouse, J. K., Seto, D. ve Gray, G. C. (2019). Are adenoviruses zoonotic? A systematic review of the evidence. *Emerging Microbes & Infections, 8(1),* 1679 – 1687.

Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., Lieshout, L. V. ve ark. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology, 285,* 110-128.

Brosch, L., Tchandja,, J., Marconi, V., Rasnake, M., Prakash, V., McKnight, T., ve Bunning, M. (2009). Adenovirus serotype 14 pneumonia at a basic military training site in the United States, spring 2007: a case series. *Military Medicine, 174(12),* 1295–1299.

Bulut O., Yapici O., Avci O., Simsek A., Atli K., Dik I. ve ark. (2013). The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *Scientific World Journal, 2013(3)*

Burke, R. M., Tate, J. E., Barin, N., Bock, C., Bowen, M. D., Chang, D. ve ark. (2018). Three rotavirus outbreaks in the postvaccine era - California, 2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report, 67(16),* 470-472.

Burrell, C. J., Howard, C. R. ve Murphy, F. A. (Eds) (2017). *Fenner and White's Medical Virology, Fifth Edition*. *Elsevier, UK.,* 263-271.

Carter, M. J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology, 98,* 1354-1380.

Caul, E. (1994). Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *The Lancet, 343(8908),* 1240-1242.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). *About Adenoviruses. Erişim: 06.12.2020, https://www.cdc.gov/adenovirus/about/transmission.html*

Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Rotavirus in the U.S*. Erişim: 13.04.2021. https://www.cdc.gov/rotavirus/surveillance.html

Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS) (2016). *Report of the Joint FSA/EFSA Workshop on Foodborne Viruses*. Erişim: 22.03.2022. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1103

Chen, S. ve Tian, X. (2018). Vaccine development for human mastadenovirus. *Journal of Thoracic Disease, 10(Suppl 19),* 2280-2294.

Chenier, S., Desroches, M., Provost, C., Bournival, V., St-Sauveur, V. G., Koszegi, M. ve ark. (2019). First reported outbreak of duck atadenovirus A tracheobronchitis in 3-week-old ducklings in Québec including whole genome sequence of the virus. *Canadian Veterinary Journal, 60(12),*1285-1288.

Cheong, S., Lee, C., Song, S. W., Choi, W. C., Lee, C. H. ve Kim, S. J. (2009). Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, *75(24),*7745-51.

Ciftcioglu, G., Hasoksuz, M. ve Aksu, H. (2007). *Detection of hepatitis A virus in mussels (Mytilus galloprovincialis) by RT-PCR and Nested PCR*. Erişim 11.04.2021, International Food and Nutrition Congress (Food for Future). https://www.researchgate.net/publication/259229946_Detection_of_Hepatitis_A_virus_in_Mussels_Mytilus_galloprovincialis_by_RT-PCR_and_Nested_PCR

Coskun, U. S. S. ve Kasap, T. (2019). Akut Gastroenteritli Çocuk Hastalarda Rotavirus ve Adenovirus Sıklığı. *Çağdaş Tıp Dergisi, 9(1),* 85-88.

Crabtree, K. D., Gerba, C. P., Rose, J. B. ve Haas, C. N. (1997). Waterborne adenovirus: A risk assessment. *Water Science and Technology, 35 (11-12),* 1-6

Crenshaw, B. J, Jones, L. B., Bell, C. R., Kumar, S. ve Matthews Q. L. (2019). Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy. *Biomedicines, 7(3):* 61.

Degertekin, H., Dalgic, G., Yukselen, V. ve Badur, S. (1995). Güneydoğu Anadolu bölgesinde akut viral hepatitlerde hepatitis E'nin yeri. *Turkish Journal of Gastroenterology,6,* 411-413.

De Wit, M. A. S., Koopmans, M. P. G., Kortbeek, L. M., Wannet, W. J. B., Vinje, J., Van Leusden ve ark. (2001). Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and Etiology. *American Journal of Epidemiology, 154(7),* 666-674.

Dey, R. S., Ghosh, S., Chawla-Sarkar, M., Panchalingam, S., Nataro, J. P., Sur, D. ve ark. (2011). Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *Journal Of Clinical Microbiology, 49(2),* 500-505.

Diez Valcarce, M., Kokkinos, P., Soderberg, K., Bouwknegt, M., Willems, K., De Roda-Husman, A. M. ve ark. (2012). Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environmental Virology, 4,* 73–80.

Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S. ve ark. (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science& Technology, 50(1),* 57-61.

D'Ugo, E., Marcheggiani, S., Fioramonti, I., Giuseppetti, R., Spurio, R., Helmi K. ve ark. (2016). Detection of human enteric viruses in freshwater from European countries. *Food Environmental Virology, 8(3),* 206-14.

Ece, G., Samlioglu, P., Ulker, T., Kose, S. ve Ersan, G. (2012). Rotavirus and adenovirus prevalence at Tepecik education and research hospital (Turkey). *Le Infezioni in Medicina, 20(2),* 100-4.

Eker, A., Tansel, Ö., Kunduracılar, H., Tokuc, B., Yulugkural, Z. ve Yuksel Mayda, P. (2009). Edirne'de erişkinlerde hepatit e virus enfeksiyonu epidemiyolojisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*; *43 (2),* 251-258

Enül, H. (2021). Çiğ ve tüketime hazır gıda örneklerinde rotavirusun moleküler tanısı. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doktora Tezi.

Garcia Zalisnak, D., Rapuano, C., Sheppard, J. D. ve Davis A. R. (2018). Adenovirus ocular infections: prevalence, pathology, pitfalls, and practical pointers. *Eye & Contact Lens Science & Clinical Practice, 44(1),* 1.

Gastanaduy, P. A., Hall, A. J. ve Parashar, U. D. (2013). Rotavirus. İçinde: Morris, J. G. ve Potter, M. E. (Eds.). *Foodborne Infections and Intoxications (Fourth Edition). Academic Press, London UK,* 338-346.

Gerba, C. P. (2015). Environmentally transmitted pathogens. İçinde: Pepper I. L., Gerba C. P., Gentry T. J. (Eds.). *Environmental Microbiology 3rd. ed.* Academic Press, San Diego CA USA, 530-551.

George, V. G., Hierholzer, J. C, Ades, E.W. (1996) İçinde: Mahy, B. WJ. ve Kangro, H. O. (Eds). *Virology methods manual*. *Elsevier, San Diego, CA.*

Ghalyoun, F. ve Alcay A. U. (2018). Investigation of rotavirus, adenovirus and astrovirus in mussels and shrimps using multiplex Real-time PCR. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24(5),* 761-767

Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology & Immunology, 4(1),* 26-33.

Ghosh, S. K., Lekshmi, M., Das, O., Kumar, S. ve Nayak, B. B. (2019). Occurrence of human enteric adenoviruses in fresh tropical seafood from retail markets and landing centers. *Journal of Food Science, 84(8),* 2256-2260

Glass, I. R., Kilgore, P. E., Holman, R. C., Jin, S., Smith, J. C., Woods, P.A. ve ark. (1996). The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. *The Journal of Infectious Disease, 174,* 5-11.

Goosney, D. L. ve Nemerow, G. R. (2003). Adenovirus infection: taking the back roads to viral entry. *Current Biology*, *13(3),* 99-100

Gray, G. C. ve Erdman, D. D. (2018). Adenovirus vaccines. İçinde Stanley A. Plotkin (Ed.), *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition).* Elsevier 121–133.

Greenberg, H. B., ve Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology, 136(6),* 1939-1951.

Grimwood, K., Carzino, R., Barnes, G. L. ve Bishop, R. F. (1995). Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *Journal Of Clinical Microbiology, 33(1),* 131-136.

Gulen, A. ve Hacımustafaoglu, M. (2013). Çocuklarda akut infeksiyöz gastroenteritlere genel yaklaşım. *ANKEM Dergisi*; *27(3),* 147-157.

Guo, Z., Tong, L., Xu, S., Li, B., Wang, Z. ve Liu, Y. (2020). Epidemiological analysis of an outbreak of an adenovirus type 7 infection in a boot camp in China. *PLOS One,* 15(6), e0232948. Erişim 18.08.2021, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7263602/

Harrison, L. ve DiCaprio, E. (2018). Hepatitis E Virus: An Emerging Foodborne Pathogen*. Frontiers in Sustainable Food Systems*, *2,* 14.

Harrach, B., Benko, M., Both, G. W., Brown, M., Davison, A. J., Echavarria, M. ve ark. (2012). Adenoviridae. İçinde: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (Eds). *Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press*,* 125 – 141.

Hasoksuz, M. (2008). Su ve Gıda Kaynaklı Viruslar , *Gıda Güvenliği Dergisi*, *4*, 48

Heim, A., Ebnet, C., Harste, G. ve Pring-Akerblom, P. (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of Medical Virology, 70(2),* 228-39.

Hierholzer, J. C. ve Killington, R. A. (1996). İçinde: Mahy, B. W ve Kangro, H. O. (Eds). *Virology methods manual*. Elsevier, San Diego, CA.

Huang, G. H. ve Xu, W. B. (2013). Recent advance in new types of human adenovirus. *Bing Du Xue Bao.; 29(3),* 342-8.

Hur, S. J., Kim, D. H., Chun, S. C. ve Lee, S. K. (2013). Effect of adenovirus and influenza virus infection on obesity. *Life Sciences, 93(16),* 531-5.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Virus Taxonomy: 2020 Release*. (2020). Erişim: 17.04.2021 https://talk.ictvonline.org/taxonomy/

Ismail, A. M., Zhou, X., Dyer, D. W., Seto, D., Rajaiya, J. ve Chodosh, J. (2019). Genomic foundations of evolution and ocular pathogenesis in human adenovirus species. *FEBS Letters, 593(24,* 3583-3608.

Ivanics, E., Palya, V., Markos, B., Dán, A., Ursu, K., Harrach, B. ve ark. (2010). Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings. *Acta Veterinaria Hungarica, 58(1),* 47-58.

Jones, T. F. ve Yackley, J. (2018). Foodborne disease outbreaks in the United States: A historical overview. *Foodborne Pathogens and Disease Volume 15(1).* 11-15

Kang G., Giri S. (2020). Enteric Adenoviruses. İçinde: Ryan, E. T., Hill, D. R., Solomon, T., Aronson, N. E., Timothy, P. E. (Eds). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases 10th Edition*. Elsevier Inc*.,* 299-302.

Karaali A. (2003). Gıda işletmelerinde HACCP uygulamaları ve denetimi. *T.C. Sağlık Bakanlığı Yayını*, Ankara. Erişim: 17.05.2021 https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/haccp.pdf

Karagun, B. S., Gursu ,H. A., Korkmaz, O., Bozdag, I. ve Hasbek, M. (2014). Beş yaşın altında akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve enterik adenovirus sıklığının araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 44(2),* 70-74.

Kızılırmak, A., Caliskan E. ve Temizkan, R. C. (2017). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus sıklığı. *Konuralp Tıp Dergisi; 9(2),* 35-39.

Kitamura, N. (2001). Genome analysis of adenovirus type 7 and adenovirus type 11. *Japanese Journal of Ophthalmology, 45(1),* 22-30.

Kirisci, O. ve Muratdagi, G. (2019). Bir devlet hastanesine akut gastroenterit ile başvuran hastalarda rotavirus ve enterik adenovirus enfeksiyonu sıklığı. *Sakarya Tıp Dergisi, 9(4),* 585-591.

Koopmans, M. ve Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology, 90(1), 23-41.*

Koopmans, M. (2012). Food borne viruses from a global perspective. İçinde: Choffnes, E. R., Relman, D. A., Olsen, L., Hutton, R., Mack, A. (Eds). *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*. *The National Academies Press Washington DC.* 248 - 274.

Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M. L., Maunula, L., Bonsdorff, C. H. ve Jaatinen P. (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 29(4),* 415-8.

Kumthip, K., Khamrin, P., Ushijima, H. ve Maneekarn, N. (2019). Enteric and non-enteric adenoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand, 2011 to 2017. *PLOS One, 14(8).*

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J. ve Black, R. E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. *PLOS One, 8(9).*

Lee, B., Damon, C. F. ve Platts-Mills, J. A. (2020). Pediatric acute gastroenteritis associated with adenovirus 40/41 in low-income and middle-income countries. *Current Opinion in Infectious Disease, 33(5),* 398-403.

Lion, T. (2014). Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews, 27(3),* 441-62.

Lu, X. ve Erdman, D. D. (2006). Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Archives of Virology, 151,* 1587-1602.

Lynch, J. P. ve Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 37(4),* 586-602.

MacLachlan, N. J. ve Dubovi E. J. (Eds) (2017). *Fenner's Veterinary Virology Fifth Edition*. Elsevier, UK, 217 – 227.

Matheny, S. C. ve Kingery, J. E. (2012). Hepatitis A. *American Family Physician, 86(11),* 1027-34.

Mickan, L. D. ve Kok, T. W. (1994). Recognition of adenovirus types in faecal samples by southern hybridization in South Australia. *Epidemiology & Infection, 112,* 603-613.

Mittal, S. K., Ahi, Y. S. veVemula, S. V. (2016). Xenogenic adenoviral vectors. İçinde: Curiel, D. T. (Ed). *Adenoviral Vectors for Gene Therapy, 2nd Edition,* Academic Press in an imprint of Elsevier, 498 – 531.

Moberg, L. J. (1995). Establishing critical limits for critical control points. İçinde: Pierson, M. D., Corlett, D. A. (Ed). *HACCP Principles and Applications,* Springer, MA, 50-61.

Modarres, S. ve Jam-Afzon, F. (2006). Enteric Adenovirus infection in infants and young children with acute gastroenteritis in Tehran. *Acta Medica Iranica, 44(5),* 349-353

Murray, C. J. L., ve Lopez, A. D. (1996). Evidence based health policy lessons from the global burden of disease study. *Science 274 (5288,* 740-3.

Murtagh, P., Cerqueiro, C., Halac, A. ve Avila, M., Kajon A. (1993). Adenovirus type 7h respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease. *Acta Paediatrica, 82(6-7),* 557-61.

Myrmel, M., Berg, E. M. M., Rimstad, E. ve Grinde, B. (2004). Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology, 70(5),* 2678–2684.

Myrmel, M. (2008). Food borne viruses progress and challenges. *Emerging Infectious Diseases, 14(11),* 1826.

Nakanishi, K., Tsugawa, T., Honma, S., Nakata, S., Tatsumi, M., Yoto, Y. ve Tsutsumi, H. (2009). Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan. *Journal of Clinical Viroogy, 46(1),* 94-7.

Nauheim, R. C., Romanowski, E. G., Araullo-Cruz, T., Kowalski, R. P., Turgeon, P. W., Stopak, S. ve ark. (1990). Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology; 97(11),* 1450-3.

Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H. ve ark. (2010). Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology, 139,* 3-15.

O'Shea, H., Blacklaws, B. A., Collins, P.J., McKillen, J. ve Fitzgerald, R. (2019). Viruses Associated with Foodborne Infections. *Reference Module in Life Sciences, 1(2),* 89-96.

Ozdemir, S., Delialioglu, N. ve Emekdas, G. (2010). Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus, Adenovirus ve Astrovirus Sıklığının Araştırılması ve Epidemiyolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyoi. Bülteni, 44,* 571-578.

Palombo, E. A. ve Bishop, R.F. (1996). Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal Of Clinical Microbiology, 34(7),* 1750-1753.

Papapetropoulou, M. ve Vantarakis, A. C. (1998). Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection, 36(1),* 101-103

Pehlivan, E., Ozen, G., Gunes, G., Karaoglu, L., Turkol, E. ve Egri M. (2009). Malatya ishal salgını (2005): Retrospektif inceleme. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 16 (4),* 213-221.

Pereira, J. G., Soares, V. M., de Souza, F. G., Tadielo, L. E., dos Santos, E. A. R., Brum, M. C. S. ve ark. (2018). Hepatitis A virus, Hepatitis E virus, and rotavirus infoods of animal origin traded at the borders of Brazil, Argentina, and Uruguay. *Food and environmental virology*, *10(4),* 365-372.

Price, A. M., Hayer, K. E, Depledge, D. P., Wilson, A. C. ve Weitzman, W. D. (2019). Novel splicing and open reading frames revealed by long-read direct RNA sequencing of adenovirus transcripts. *BioRxiv.* Erişim: 12.12.2020, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2019.12.13.876037v1.full

Pond K. ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2005). Water, Sanitation and Health Team. Water recreation and disease: plausibility of associated infections:

acute effects, sequelae and mortality. *IWA Publishing, London, UK*. Erişim: 03.12.2021, https://apps.who.int/iris/handle/10665/43338

Powledge, T. M. (2004). Is obesity an infectious disease? *Lancet Infectious Disease, 4(10),* 599.

Purpari, G., Macaluso, G., Di Bella, S., Gucciardi, F., Mira, F., Di Marco, P. ve ark. (2019). Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. Int. *Journal of Infectious Disease, 80,* 66-72.

Rajaiya, J., Saha, A., Ismail, A. M., Zhou, X., Su, T. ve Chodosh, J. (2021). Adenovirus and the Cornea: More Than Meets the Eye. *Viruses. 13(2),* 293.

Resmi Gazete (2008). Gıda güvenliği ve kalitesinin denetimi ve kontrolüne dair yönetmelik. *Erişim: 18.02.2020 https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2008/09/20080926-4.htm*

Resmi Gazete (2011a). Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği. Erişim: 02.02.2020 https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111227-10.htm

Resmi Gazete (2011b). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. *Erişim: 02.02.2020 https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm*

Rhee, E. G. ve Barouch, D. H. (2015). Adenoviruses. İçinde: Benneth, J. E, Dolin, R., Blaser, M. J. (Eds.) *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 8th. ed*., Saunders, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia, 2371 - 2381.

Roberts, J. R. ve Souillard, R., Bertin J. (2011). Avian diseases which affect egg production and quality. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products,* 376-393.

Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W. ve Chodosh, J. (2011). Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution, 11(6),* 1208–1217.

Rozwadowski, F., Caulcrick-Grimes, M., McHugh, L., Haldeman, A. M.; Fulton T., Killerby, M. ve ark. (2018). Notes from the field: fatalities associated with human adenovirus type 7 at a substance abuse rehabilitation facility — New Jersey. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 67,* 371–372.

Rutala, W. A., Peacock, J. E., Gergen, M. F., Sobsey, M. D. ve Weber, D. J. (2006). Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(4),* 1419–1424.

Saha, B., Wong, C.M. ve Parks R. J. (2014). The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses, 6(9),* 3563-3583.

Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., Morino, H., Lee, C., Maeda, K. ve ark. (2010). Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Science, 15(2),* 45- 49.

Sarac, F., Gulyaz, V., Hasoksuz, M., Uzar, S., Gulacti, I., Satir E. ve ark. (2021). Genetic analysis of canine adenovirus type 2 strains circulating in Turkey from past to present. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 32 (2),* 111-117.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L. ve ark. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases, 17(1),* 16-22.

Scharff, R. L. (2015). State estimates for the annual cost of foodborne illness. *Journal of Food Protection, 78(6),* 1064–1071.

Schwartz, K. L., Richardson, S. E., MacGregor, D., Mahant, S., Raghuram, K. ve Bitnun, A. (2019). Adenovirus associated central nervous system disease in children. *The Journal of Pediatrics, 205,* 130-137.

Seymour, I. J. ve Appleton, H. (2001). Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of applied microbiology, 91(5),* 759-773.

Shimizu, H., Phan, T. G., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N. ve Ushijima, H. (2007). An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. Infection, *Genetics and Evolution, 7(2),* 279–284.

Smith, A. C., Poulin, K. L. ve Parks, R. J. (2009). DNA genome size affects the stability of the adenovirus virion. *Journal Virology, 83(4):*2025-2028.

Sykes, J. E. (2014). Infectious Canine Hepatitis. *Canine and Feline Infectious Diseases,* 182-186.

Swenson, P. D., Lowens, M. S., Celum, C. L. ve Hierholzer J. C. (1995). Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Clinical Microbiology,33(10),* 2728-2731.

Tamer, C. ve Gumusova S. (2018). Ters Zoonotik Viral Enfeksiyonlar. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15(2),* 154-160.

Thompson, S. S., Jackson, J. L., Suva Castillo, M., Yanko, W. A., Jack, Z. E., Kuo J. ve ark. (2003). Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environment Research, 75(2),* 163-170.

Thurston Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Riley, K. ve Gerba, C. P. (2003). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Applied And Environmental Microbiology, 69(1),* 577-582.

Thurston Enriquez, J. A, Haas, C. N., Jacangelo, J. ve Gerba C. P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research, 39(15),* 3650-3656.

Trentin, J. J., Yabe, Y. ve Taylor, G. (1962). The Quest for Human Cancer Viruses. A new approach to an old problem reveals cancer induction in hamsters by human adenovirus. *Science, 137(3533),* 835-841.

Uhnoo, I., Olding-Stenkvist, E. ve Kreuger, A. (1986). Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses, and bacteria. *Archives of Disease in Childhood, 61(8),* 732-738.

Usman, N. ve Suarez, M. (2022). Adenoviruses. *StatPearls Publishing*, Erişim: 17.01.2022, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559072/

Uyar, Y., Carhan A., Ozkaya E. ve Ertek M. (2008). Türkiye'de 2008 yılında ortaya çıkan ilk norovirus salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni, 42,* 607-615.

Van, R., Wun, C. C., O'Ryan, M. L., Matson, D. O., Jackson, L. ve Pickering, L. K. (1992). Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. *The Journal of Pediatrics, 120(4),* 516-521.

Varisli, A.N., Tekin S. ve Bicak I. (2019). Akut gastroenterit olgularında rotavirus ve adenovirus ne kadar sorun?: dört yıllık sonuçlar. *KLIMIK Journal; 32(1),* 67-70.

Velebit, B., Djordjevic, V., Milojevic, L., Babic, M., Grkovic, N., Jankovic, V. ve ark. Yushina Y. (2019). The common foodborne viruses: A review. *IOP conference series: Earth and Environmental Science, 333.*

Villena, C., Gabrieli, R., Pinto, R. M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E. ve ark. (2003). A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiology & Infection 131(3),* 1105-1110.

Wadell, G. (1979). Classification of human adenoviruses by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. *Intervirology, 11(1):*47-57.

Wiegering, V., Kaiser, J., Tappe, D., Weißbrich, B., Morbach, H. ve Girschick, H. J. (2011). Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients. *International Journal of Infectious Diseases, 15(6),* 401–407.

Wilhelmi, I, Roman E. ve Sanchez Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection, 9,* 247-262.

Ye, F., Han, Y., Zhu, J., Li, P., Zhang, Q., Lin, Y. ve ark. (2020) First Identification of Human Adenovirus Subtype 21a in China with MinION and Illumina Sequencers. *Frontiers in Genetics, 11,* 285.

Ye, S., Whiley, D. M., Ware, R. S., Sloots, T. P., Kirkwood, C. D., Grimwood, K. ve ark. (2017). Detection of viruses in weekly stool specimens collected during the first 2 years of life: A pilot study of five healthy Australian infants in the rotavirus vaccine era. *Journal of medical virology, 89(5),* 917–921.

Yilmaz, H., Bostan, K., Turan, N., Muratoglu, K., Yilmaz, A., Ozkul, A. A ve ark. (2010). Real-time PCR detection of norovirus in mussels collected from the Bosphorus in Istanbul, Turkey. *Food and Environmental Virology, 2(2),* 64- 68.

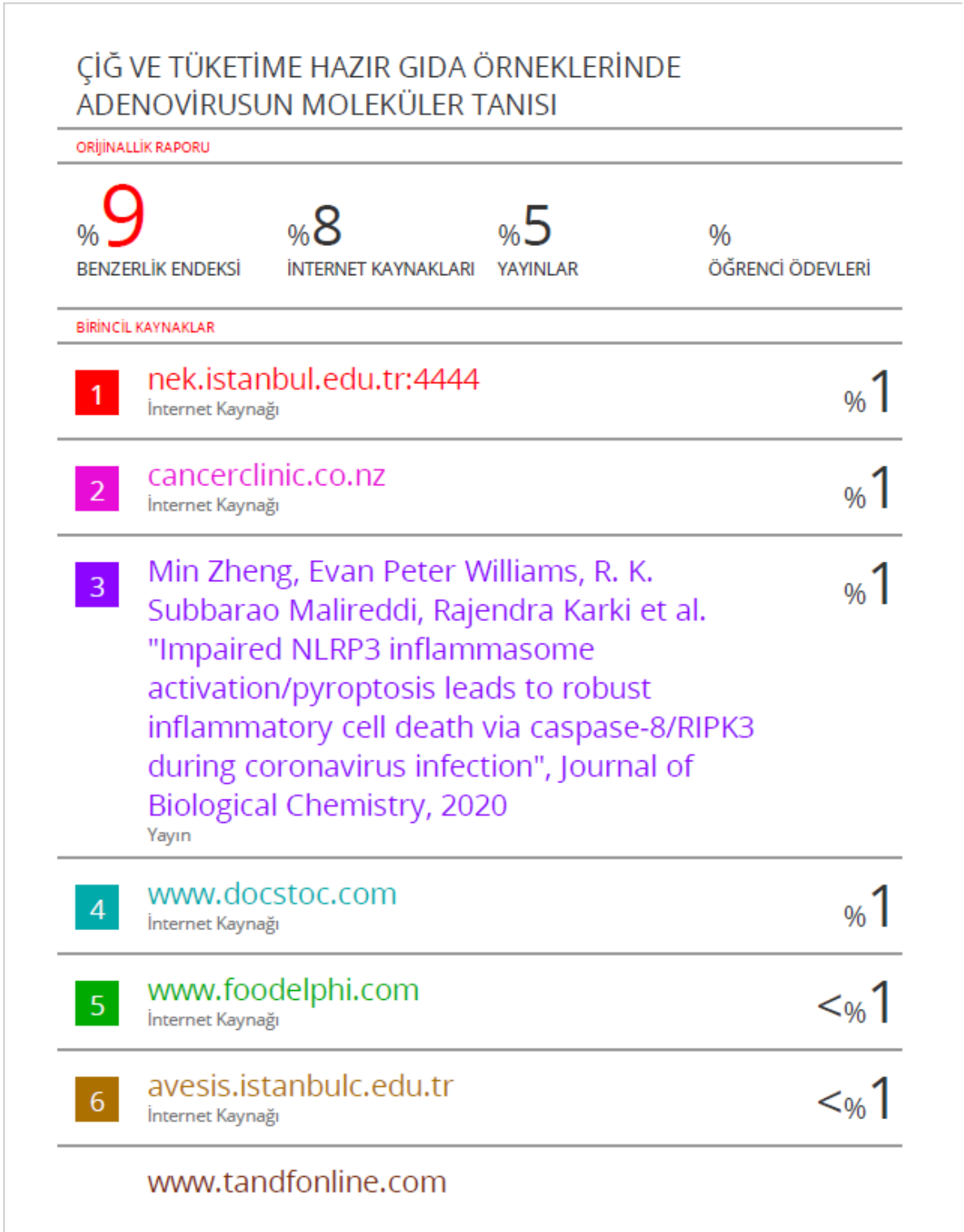
Yilmaz, A., Bostan, K., Altan, E., Muratoglu, K., Turan, N., Tan, D. ve ark.(2011). Investigations on the frequency of norovirus contamination of ready-to-eat food items in Istanbul, Turkey, by using real-time reverse transcription PCR. *Journalof Food Protection*, *74(5),* 840-843.

Yilmaz, H., Cizmecigil, U., Altan Tarakci, E., Aydın O., Yilmaz A., Calicioglu, M. ve ark. (2018). Investigation of Hepatitis A and E Viruses in Mussels Collected from the Bosphorus, in Istanbul, Turkey – Short Communication. *Czech Journal of Food Sciences, 36(3),* 215–220.

Zakhartchouk, A., Bout, A., Woods, L. W., Lehmkuhl, H.D. ve Havenga, M.J. (2002). Odocoileus hemionus deer adenovirus is related to the members of Atadenovirus genus. *Archives of Virology, 147(4),* 841-847.

Zhang, S., Chen, T.-H., Wang, J., Dong, C., Pan, J., Moe, C. ve ark. (2011). Symptomatic and asymptomatic infections of rotavirus, norovirus, and adenovirus among hospitalized children in Xi'an, China. *Journal of Medical Virology, 83(8),* 1476–1484.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



ÇİĞ VE TÜKETİME HAZIR GIDA ÖRNEKLERİNDE ADENOVİRUSUN MOLEKÜLER TANISI

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%8	%5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
2	cancerclinic.co.nz İnternet Kaynağı	%1
3	Min Zheng, Evan Peter Williams, R. K. Subbarao Malireddi, Rajendra Karki et al. "Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection", Journal of Biological Chemistry, 2020 Yayın	%1
4	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	%1
5	www.foodelphi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
	www.tandfonline.com	