T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ÇİĞ VE TÜKETİME HAZIR GIDA ÖRNEKLERİNDE ROTAVİRUSUN MOLEKÜLER TANISI

HAKAN ENÜL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA HASÖKSÜZ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
VİROLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Gıda Kaynaklı Hastalıklar ve Virusların Önemi 3
2.1.1. Gıda Kaynaklı Virusların Yaygınlığı 6
2.1.1.1. Tüketime Sunulan Gıda Ürünlerinde Virusların Varlığı 7
2.1.1.2. İnsanlarda Kontamine Gıdaların Tüketilmesiyle Oluşan Vakalar 8
2.1.1.3. Ülkemizde Görülen Virus Kaynaklı Salgınlar 10
2.2. Rotavirusun Epidemiyolojisi 11
2.2.1. İnsanlarda Rotavirus İnfeksiyonu 11
2.2.2. Hayvanlarda Rotavirus İnfeksiyonları 15
2.3. Etiyoloji 16
2.3.1. Tarihçesi 16
2.3.2. Rotavirusun Yapısı 17
2.3.3. Rotavirusun Sınıflandırması 20
2.3.3.1. Antijenik özelliklerine göre sınıflandırma 20
2.3.3.2. Poliakrilamid jel elektroforez görüntüsüne göre sınıflandırma 21
2.3.3.3. Tüm segmentlerin gen dizilimine göre sınıflandırma 21
2.3.4. Rotavirusun Replikasyonu 22
2.4. Rotavirusun Patogenezi ve Klinik Belirtiler 24
2.5. Moleküler Epidemiyolojisi 27
2.5.1. Dünyada Tespit Edilen Rotavirusların Moleküler Epidemiyolojisi 27
2.5.2. Türkiye‘de Tespit Edilen Rotavirusların Moleküler Epidemiyolojisi 30

2.6. Rotavirusun Reassortment Mekanizması ve Türler Arası Geçiş 32
2.7. Rotavirusun Dayanıklılığı ve İnaktivasyonu 34
2.8. Rotavirusun Tanısı 35
2.8.1. Gıdalarda Rotavirusun Moleküler Yöntemlerle Saptanması 36
2.9. Rotavirus İnfeksiyonlarında Koruma ve Kontrol 36
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40
3.1. GEREÇ 40
3.1.1. Gıda Örnekleri 40
3.1.2. Moleküler Teşhis Materyalleri 41
3.1.2.1. Viral RNA Ekstraksiyon Kiti 41
3.1.2.2. cDNA Sentezi 41
3.1.2.3. Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 42
3.1.2.4. Purifikasyon Kiti 43
3.1.2.5. Pozitif Kontrol 43
3.1.2.6. Moleküler Testlerde Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar 43
3.1.3. Virus İzolasyonu için Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller 43
3.1.3.1. Hücre Kültürü 43
3.1.3.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Rotavirus İzolatı 43
3.1.3.3. Hücre Üretme Vasatı 44
3.1.3.4. Phosphate Buffer Saline (PBS) 44
3.1.3.5. Tripsin-EDTA solusyonu 44
3.1.3.6. Fötal Bovine Serum (FBS) 44
3.1.3.7. Antibiyotik Solusyonu 44
3.1.3.8. L-glutamine 44
3.1.3.9. Virus İzolasyon Vasatı 44
3.1.3.10. Alkaline Tripsin Versene (ATV) Solusyonu 44
3.2. YÖNTEM 45
3.2.1. Gıda Örneklerinin Homojenizasyonu 45
3.2.2. Moleküler Teşhis Çalışmaları 46
3.2.2.1. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu 46
3.2.2.2. cDNA Sentezi 47
3.2.2.3. A Grubu Rotavirusun VP4 Proteinine Spesifik Gen Bölgesi için RT-PCR. 49
3.2.2.4. A Grubu Rotavirusun VP7 Proteinine Spesifik Gen Bölgesi İçin RT-PCR:50

3.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforez 51
3.2.2.6. Elde Edilen PCR Ürünün Purifikasyonu 51
3.2.2.7. Sekans İşlemleri 51
3.2.3. Virus İzolasyon Çalışmaları 52
3.2.3.1. Hücrelerin Çözündürülmesi 52
3.2.3.2. MA-104 Hücre Kültürünün Pasajlanması 52
3.2.3.3. İnokulumun Hazırlanması 52
3.2.3.4. MA-104 Hücre Kültürüne İnokulasyon 53
3.2.4. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi 54
4. BULGULAR 55
4.1. PCR Sonuçları 55
4.2. Sekans Sonuçları 56
4.2.1. VP4 Gen Bölgesi Sekans Analizi 56
4.2.2. VP7 Gen Bölgesi Sekans Analizi 58
4.3. Virus İzolasyon Sonuçları 59
4.4. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 60
5. TARTIŞMA 62
KAYNAKLAR 74
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 101

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: A grubu rotaviruslarının G(VP7) ve P(VP4) genotipleri ile bunların görüldüğü konakçılar.....13
Tablo 2: Rotavirusun proteinleri, fonksiyonları ve genotip özellikleri (Estes ve Greenberg; 2013): 19
Tablo 3: RotaTeq aşısının bir suşunun ve Rotarix aşı suşunun tüm gen segmentlerinin dizilimine göre örnek sınıflandırma modeli (Matthijnssens ve ark., 2011).....21
Tablo 4: Rotavirusun genotipleri (Desselberger, 2014).....22
Tablo 5: 2007-2012 yılları arası verilere göre genotiplerin kıtalara yayılımında vaka sayıları ve oranları (Doro ve ark., 2014).....30
Tablo 6: Ülkemizde rotavirus genotiplerinin dağılımı (Tapısız ve ark. 2019) 31
Tablo 7: Mevcut lisanslı aşılar (Banyai ve ark., 2018, Burke ve ark. 2019) 38
Tablo 8: Klinik deneyleri devam eden aday aşılar (Kirkwood ve ark., 2019).....38
Tablo 9: Çalışılan gıda örneklerinin ürün grupları ve adedi. 40
Tablo 10: A grubu Rotavirus tespiti için kullanılan primer dizilimleri. 42
Tablo 11: cDNA sentezi için kullanılan mastermix içeriği: 48
Tablo 12: cDNA sentezi için sıcaklık-zaman döngüsü:.....48
Tablo 13: A grubu Rotavirusun VP4 gen bölgesi için RT-PCR mastermix içeriği:.....49
Tablo 14: A grubu Rotavirusun VP4 gen bölgesi için RT-PCR sıcaklık-zaman döngüsü: 49
Tablo 15: A grubu Rotavirusun VP7 gen bölgesi için RT-PCR mastermix içeriği:.....50
Tablo 16: A grubu Rotavirusun VP7 gen bölgesi için RT-PCR sıcaklık-zaman döngüsü: 50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: 2013 yılında rotavirusa bağlı 5 yaş altı çocuk ölümleri dağılımı (DSÖ,2016) . 12
Şekil 2: Rotavirusun yapısal organizasyonu. 18
Şekil 3: Rotavirus replikasyon şeması (Trask ve ark., 2012) 24
Şekil 4: Rotavirus patogenezinin şematik görüntüsü 26
Şekil 5: Yıllara göre dünya genelinde tespit edilen rotavirus genotiplerinin dağılımı .. 29
Şekil 6: Homojenize edilmek üzere ayıklanan midye örnekleri 45
Şekil 7: Gıda ürünlerini parçalama ve homojenizasyon işlemleri 46
Şekil 8: Elde edilen üst sıvının santrifüj işlemi 46
Şekil 9: 79 no'lu rotavirus poztif midye örneğinden hücre kültürüne ekim flaskları 54
Şekil 10: VP4 geni ile yapılan RT- PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü 55
Şekil 11: VP7 geni ile yapılan RT- PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü 56
Şekil 12: Elde edilen kromotogramların Chromas programıyla görüntülenmesi 57
Şekil 13: 79 numaralı midye örneğinde saptanan rotavirusun VP4 gen bölgesinin Neighbor-Joining methodu ile NCBI'da rapor edilen suşlarla oluşturulmuş soyağacı .. 57
Şekil 14:Elde edilen DNA diziliminin referans G tipleri ile hizalama işlemi 58
Şekil 15: 79 numaralı midye örneğinde saptanan rotavirusun VP7 gen bölgesinin Neighbor-Joining methodu ile NCBI'da rapor edilen suşlarla oluşturulmuş soyağacı .. 59
Şekil 16: Pozitif kontrolün hücre kültüründe CPE oluşumları 60
Şekil 17: Gıda Örneklerinde Rotavirus Pozitifliği 61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Bp	: Base pair
cDNA	: Komplementer Deoksiribo nükleik asit
CPE	: Cytopathic effect
dsRNA	: Double-stranded ribonucleic acid
DLP	: Double-layered particles
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	: European Food Safety Authority
ESS	: Enterik Sinir Sistemi
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
ER	: Endoplazmik retikulum
HAV	: Hepatitis A Virus
HEV	: Hepatitis E Virus
HPAI	: Highly Pathogenic Avian Influenza
KCl	: Potasyum klorür
MA-104	: Afrika yeşil maymunu böbrek hücresi
mRNA	: Messenger ribonucleic acid
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NSP	: Non-structural protein
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
RCWG	: Rotavirus Classification Working Group
RNA	: Ribonucleic acid

RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SARS-CoV : Severe acute respiratory syndrome coronavirus

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez

TBE : Tick-borne encephalitis

TLP : Triple-layered particles

VP : Viral protein

ÖZET

Enül H. (2021). Çiğ ve Tüketime Hazır Gıda Örneklerinde Rotavirusun Moleküler Tanısı. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Viroloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Son yıllarda insanlarda görülen ve bazen de salgınlar haline gelen gıda kaynaklı hastalıkların etkenlerinin içerisinde virusların da bulunduğu birçok araştırmada gösterilmiştir. Gıda kaynaklı virusların başlıcaları norovirus, hepatitis A virusu, rotavirus, adenovirus, enterovirus, astrovirus ve aichiviruslardır. Rotaviruslar gastroenterite neden olan, her yaştan kişiyi etkileyen ve gıdalarla da bulaşabildiği kanıtlanan viruslardır. Gıdalar, çiftlikten veya tarladan soframıza ulaşana kadar geçirdiği serüvenin herhangi bir aşamasında rotaviruslarla kontamine olabilmektedirler.

Ülkemizde gıda kaynaklı viruslardan Norovirus ve Hepatitis A viruslarının varlığı araştırmalarla gösterilmiştir. Fakat yaptığımız incelemelerde gıdalarda rotavirusun varlığına yönelik bir bildirim saptanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda çiğ ve tüketime hazır çeşitli gıda örneklerinde rotavirusun saptanması ve pozitif örneklerde virusun izolasyonuna yönelik araştırma yapıldı.

Araştırmamızda, deniz mahsülleri (midye, balık vs.), kırmızı et ürünleri (sucuk, köfte vs.) ve beyaz et ürünlerinden (jambon, kanat vs.) 105 adet örnek toplandı. Toplanan örnekler RT-PCR metodu ile rotavirusun varlığı yönünden incelendi. Rotavirus saptanan örneklerden MA-104 hücre kültürüne ekimleri yapıldı. Pozitif örneklerin genotiplendirmesi için de DNA dizilimi ve filogenetik analizler yapıldı.

Çalışmada RT-PCR incelemeleri sonucu 2 adet midye numunesinde rotavirus saptandı. Pozitif saptanan midye örneklerinin birinde VP4 ve VP7 gen bölgesinin DNA diziliminin analizi sonucunda A grubu rotavirus olduğu ve genotipinin de G1P[8] olduğu belirlendi. Pozitif saptanan örneklerin hücre kültürüne inokülasyonu sonucunda virusun izolasyonu saptanmadı.

Bu çalışmada saptanan rotavirusun, ülkemizde insanlarda yaygın olarak görülen A grubu rotavirus G1P[8] genotipi olduğu belirlenmiştir. Çocuklarda yaygın olarak görülen ve kaynağı konusunda kesin bilgilere sahip olamadığımız rotavirus infeksiyonlarının gıda kaynaklı olabileceği de düşünülerek hijyenik önlemlere daha çok dikkat edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, Genotip, Gıda kaynaklı, Rotavirus, RT-PCR

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25583

ABSTRACT

Enul H. (2021). Molecular diagnosis of rotavirus in raw and ready-to-eat food samples. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Virology. PhD Thesis,Istanbul.

In recent years, it has been shown in many studies that viruses are the one of the common factors of foodborne diseases of human. Sometimes these diseases may seen as epidemics. Norovirus, hepatitis A virus, rotavirus, adenovirus, enterovirus, astrovirus and aichiviruses are known as the most common foodborne viruses. Rotaviruses cause gastroenteritis, affect people of all ages and have been proven to be transmitted via food. Food can be contaminated with rotavirus at any stage of food processing, from farm to fork.

The studies in Turkey have shown that norovirus and hepatitis A virus has been detected in food. However, to our knowledge, presence of rotavirus in foods has not been reported before. Therefore, in this study, a research was carried out to investigate the presence of rotavirus in raw and ready-to-eat food samples and to isolate the virus from positive samples.

In this study, 105 samples were collected from seafood (mussels, fish, etc.), red meat products (sausage, meatballs, etc.) and white meat products (ham, wings, etc.). The samples were tested for the presence of rotavirus by RT-PCR method. Rotavirus contaminated samples were inoculated into MA-104 cell culture. DNA sequencing and phylogenetic analysis were performed for the genotyping of positive samples.

Rotavirus was detected in 2 mussel sample groups by RT-PCR. DNA sequence analysis was carried out of both VP4 and VP7 gene regions of the rotavirus for one sample and determined that it was a group A human rotavirus G1P[8]. The rotavirus isolation did not occur after the inoculation the samples to cell culture.

The rotavirus detected in this study was determined to be the group A rotavirus G1P[8] genotype, which is common in people in Turkey. Rotavirus infections are common in children and there is a lack of information on the role of food-borne transmission. Considering this factor, more attention should be paid to hygienic measures.

Key Words: Cell line, Genotype, Foodborne, Rotavirus, RT-PCR

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. TDK-2017-25583

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada değişen gıda tüketim alışkanlıkları, kalabalıklaşan şehirler, endüstriyel gıda üretimi, gıdaların uluslararası ticaretinin yaygınlaşması gibi faktörler gıda kaynaklı hastalıkların görülme oranını ve bu hastalıkların önemini arttırmıştır. Gıda sektöründe düşük hijyen koşulları insanlarda gastroenterit gibi önemli vakalara yol açmaktadır. Ortaya çıkan gastroenterit vakalarının büyük kısmı bakteriyel kaynaklı olsa da virus kaynaklı gastroenteritler de oldukça yaygındır. Gıdalarda mikrobiyolojik kontrollerin genelde bakterilere karşı oluşturulmuş olması, virusların sistematik izlenme eksikliği, çok az sayıda ülkenin gıda kaynaklı viral hastalıkları raporlaması, gıda kaynaklı virusların önemini ve bu konuda daha çok çalışma gereğini ortaya çıkartmaktadır.

Gıdalar, çiftikten sofraya kadar olan serüvenlerinin herhangi bir noktasında viruslarla kontamine olabilmektedir. Gıda kaynaklı virusların salgınlara yol açmasında sorumlu olan yiyecekler arasında en riskli ürünler sebze, meyveler ve kabuklu deniz ürünleridir. Bunun yanı sıra hayvansal gıda ürünlerine bağlı salgınlar da oluşabilmektedir (Painter ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda, gıdalara virusların bulaşmasındaki etkenler olarak; kanalizasyon sularının karıştığı yeraltı sularının sebze ve meyve yetiştirmede kullanılması, çiğ olarak tüketilecek sebze ve meyvelerin kontamine su ile yıkanması ve kabuklu deniz hayvanlarının kontamine alanlardan toplanması olarak bildirilmektedir. Ayrıca gıda ürünü son tüketiciye ulaşana kadar toplu tüketim yerlerinde, büfe ve kantinlerde de virusla kontamine olabilmektedir (Hasöksüz, 2008). Bu tür bulaşmanın en önemli kaynağının infekte gıda çalışanları olduğu bildirilmiştir (Koopmans ve Duizer, 2004).

Rotaviruslar beş yaş altı çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin etyolojisinde yer alan viral etkenler arasında en önemli yere sahip oldukları gibi aynı zamanda yetişkinlerde de infeksiyona yol açmaktadırlar (Parashar ve ark., 2009). Ülkemizde gastroenteritlere neden olan patojenlerin araştırıldığı birçok çalışmada rotavirusun yaygın görülen bir etken olduğu ortaya konulmuştur. Her ne kadar rotavirusun gıdalarla bulaşabildiği bilinse de, bu bulaşmanın görülen vakaların ne kadarından sorumlu olduğu konusunda bilgi eksikliği bulunmaktadır.

Ülkemizde gıdalarda rotavirusun varlığı bildirilmediğinden bu çalışmada gıda örnekleri olarak çiğ etler (dana, koyun ve tavuk etleri), bu etlerin tüketime sunulmuş

şekilleri (sosis, salam vb) ile midye-kalamar gibi deniz ürünlerinin rotavirusun varlığı yönünden reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) metodu ile araştırılması ve pozitif bulunan örneklerden virus izolasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Gıda satış ve toplu tüketim yerlerinden toplanan gıda örneklerinin rotavirus varlığı yönünden test edilmesinin ardından saptanan rotavirusların yüzey proteinlerinin gen bölgelerinin DNA dizilimleri yapılarak G ve P tiplerinin belirlenmesi, rotavirus saptanan gıda örneklerinden hazırlanan inokulumların MA-104 hücrelerine inokulasyonu sonucu virusun izolasyonu planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Kaynaklı Hastalıklar ve Virusların Önemi

İnsanlarda sindirim sistemi infeksiyonları düşünüldüğünde, 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 ilk ortaya çıkışın gıda maddelerinin bu bulaşmada birer fomit olarak görev yaptığı saptanmaktadır (Carter ve ark., 2005; Hasöksüz, 2008). Gastroenterit vakalarının birçoğu hafif semptomlarla atlatılabilirken, hastaneye başvurma, hastanede yatış ve gastroenterit sebebiyle ölüm vakaları da görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2005 yılında büyük ölçüde kontamine yiyecek ve içme suyuna atfedilebilen ishalli hastalıklardan 1,8 milyon kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Newell ve ark., 2010). Gıda kaynaklı hastalıklar sadece az gelişmiş ülkelerin değil aynı zamanda gelişmiş ülkelerin de büyük bir sorunudur. Her yıl yalnızca ABD‘de 325.000 hastaneye yatış ve 5.000 ölümle sonuçlanan yaklaşık 76 milyon gıda kaynaklı hastalık vakasının meydana geldiği tahmin edilmektedir (Mead ve ark., 1999). Vakaların çoğunun hafif atlatılması sebebiyle sirküle olan mikroorganizmaların önemi çoğu zaman hafife alınmakla birlikte aynı mikroorganizmalar sebebiyle salgınlar oluşabilmektedir. Hollanda‘da yapılan bir araştırmaya göre 2009 yılında hastaneye kaydı yapılmış bütün vakaların %60‘ını gastroenteritler oluşturmaktadır (Havelaar ve ark., 2012).

Gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan patojenler araştırıldığında sadece düşük bir oranın belli bir mikroorganizma kaynaklı olduğu saptanabilmektedir (Scallan ve ark., 2011). Avusturalya‘da gıda kaynaklı gastroenteritlerin araştırıldığı bir çalışmada meydana gelen 14.700 vakanın 10.000‘inin tespit edilemeyen bir etkenden kaynaklandığı bildirilmiştir (Hall ve ark., 2005). İnfeksiyon etkenlerinin saptanmasındaki yetersizlik, laboratuvar çalışmalarıyla mikroorganizmanın tespitinin yapılamamasından kaynaklanırken aynı zamanda çoğu ülkede gastroenterit vakalarının araştırılmasıyla ilgili yeterli bir veritabanının oluşturulmaması da ayrı bir faktördür. Ayrıca var olan araştırmaların çoğunlukla patojen bakteriler üzerine kurulu olduğu için viral etkenlerin gözden kaçırılmasına neden olmaktadır.

Gıda Maddeleri İçin Mikrobiyolojik Kriterler Hakkında Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğünün 2073/2005/EC sayılı düzenlemesinde, kabuklu deniz ürünleri dışındaki gıda ürünlerinin mikrobiyolojik kriterlerinin bakteriyel yük üzerinden değerlendirildiği görülmektedir (Avrupa Komisyonu, 2005). Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde kontamine şüpheli gıdaların bakteriler yönünden taranması uygun görülmüş ve viruslar yönünden taranmasına dair bir ifade belirtilmemiştir (Resmi Gazete, 2011). Gıda kaynaklı virusların önemi arttıkça dünyada bu konuda izleme faaliyetleri de zaman içerisine oluşturulmaya başlanmıştır. Amerika'da yapılan bir araştırmada 1998-2008 yılları arasında gıda kaynaklı hastalıkların etkenleri ve etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada gıda kaynaklı mikroorganizmaların ve kimyasalların neden olduğu hastalıkların %57.16'sının viral etkenlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu viral etkenlerle hastalık oluşturan gıdaların %30'unun hayvansal kökenli olduğu ortaya konulmuştur (Painter ve ark., 2013). Maed ve arkadaşlarına (1999) göre ise gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu tüm hastalıkların neredeyse %67'si tek başına viruslardan kaynaklanmaktadır.

Gıda ürünlerinin kontaminasyonu sonucu insanlarda infeksiyonlara neden olan başlıca viruslar: norovirus, hepatit A virusu, hepatit E virusu, rotavirus, adenovirus, sapovirus, astrovirus, aichi virus ve enteroviruslardır (Banyai ve ark. 2018; Koopmans ve Duizer, 2004). Ayrıca DSÖ (2008), SARS-CoV, H5N1 ve Nipah viruslarının da gıda kaynaklı viruslar içerisinde değerlendirmiştir. Günümüzde dünyadaki ekonomik, kültürel, demografik ve sosyolojik değişiklikler göz önüne alındığında, yeni virusların ortaya çıkma veya mevcut virusların mutasyonik değişime bağlı yeni tiplerinin oluşma olasılığının kaçınılmaz olduğu konusunda fikir birliği vardır (Newell ve ark. 2010). Bu tip yeni virusların gıda kaynaklı olarak insanlarda infeksiyonlara neden olup olmadığı sorusu gündemde bulunmaktadır. Örneğin, 2003 yılında oluşan salgında SARS-CoV virusunun yarasa dışkılarında bulunduğu saptanmış ve gıda kaynaklı olarak insanlara bulaşmış olabileceği ileriye sürülmüştür (Lau ve ark., 2005). Aynı şekilde infeksiyöz H5N1 kuş gribi virusu ile ördekler üzerinde yapılan deneysel çalışmada H5N1 virusu, ördek eti ve kanından da izole edilmiş olması bu iddiayı güçlendirmektedir (Tumpey ve ark. 2002).

Viruslar doğaları gereği sadece canlı hücreler içinde çoğalabilirler. Gıdalar, virusları hedef konakçıya ulaştırana kadar sadece birer transport aracı gibi görev

yaparlar. Dolayısıyla virusla kontamine olan gıdalarda, bakteriyel kontaminasyonlarda olduğu gibi kokuşma, bozulma veya renk değişimleri gözlenmez. Bu durum ise virusların gıda ile sofraya ulaşmasında duyusal olarak herhangi bir ön muayeneyi imkansız kılmaktadır. (Jaykus, 2000; Newell ve ark. 2010; Bozkurt ve ark., 2015).

Gıda kaynaklı virusların çoğu çok bulaşıcıdır, bir kişi dışkı veya kusma ile çevreye oldukça yüksek miktarda virus saçabilir. En yaygın gıda kaynaklı viruslar için, çok az sayıda canlı virion (10–100) yüksek infeksiyon olasılığına neden olabilirken, infekte olmuş bireylerin dışkı örneklerinde yüksek miktarda virus bulunabilir. Rotavirusun miktarının dışkının gramında 10^{11} virion olduğu bildirilmiştir (Koopman ve Duzier; 2004). Norovirusun dışkıdaki miktarının moleküler yöntemle araştırıldığı bir çalışmada gramda 10^{8}-10^{10} cDNA kopyasının bulunduğu bildirilmiştir (Chan ve ark., 2006). Gıda kaynaklı virusların bulaşıcılığının çok yüksek olması nedeniyle gıda kaynaklı bir bulaşmada ilk vakalar tespit edilmedikçe, infeksiyon kaynağı gıdaya atfedilmeyip, kişiden kişiye bulaşan bir salgın olarak tanımlanabilmektedir (Newell ve ark, 2010).

Gıdalar, çiftikten sofraya kadar olan serüvenlerinin herhangi bir noktasında viruslarla kontamine olabilmektedir. Gıda kaynaklı virusların salgınlara yol açmasında sorumlu olan yiyecekler arasında en riskli ürünler sebze, meyveler ve kabuklu deniz ürünleridir. Bunun yanı sıra hayvansal gıda ürünlerine bağlı salgınlar da oluşabilmektedir. Bu ürünlerden sebze ve meyve gibi bazı gıda ürünleri pişirilmeden tüketildiği için, pişirilerek tüketilen gıdaların da yeterli ısıl işlem görmeden tüketilmesi durumunda risk oluştururlar (Baert ve ark., 2009; Carter ve ark, 2005; Richards, 2001).

Kabuklu deniz ürünleri, beslenme işlemi sırasında suyu filtreyerek virusları çevredeki sudan alırlar ve viruslar kabuklu deniz hayvanlarında bu yolla yoğunlaşır. Genellikle insanların yaşam alanlarının çevresindeki kıyılardan toplanan kabuklu deniz ürünlerinin kanalizasyon suları ile teması sonucu bir çok gıda kaynaklı virusu bünyesinde bulundurabilir (Smulders ve ark., 2013).

Bazı virusların zoonotik özellikte olması sebebiyle kesim esnasında karkasın hayvanın dışkısıyla temas etmesi ve tüketilmeden önce yeteri kadar pişirilmemesi sonucu (Machnowska ve ark., 2014) veya sütte bulunabilecek TBE virusu gibi infeksiyoz bir etkenin inaktive edilmesi için pasterizasyon işlemi yapılmadan tüketilmesi sonucu gıda yoluyla viruslar alınabilir (Kohl ve ark. 1996).

Sebze ve meyvelerin üretim döneminde kullanılan kontamine sudan, hasat sırasında veya sevkiyattan önce ürünü temizlemek için kullanılan durulama suyundan, ürünün yetiştirilme mevsiminde yoğun yağış dönemlerinde kanalizasyondan taşan su vasıtasıyla gıda ürünleri virusla kontamine olabilmektedir. Bazı ürünlerin hasat, paketleme veya hazırlığı sırasında ürünü işleyen işçilerin ellerinden doğrudan kontaminasyon olabildiği bildirilmiştir. (Smulders ve ark., 2013).

Ürün sevkedilip tüketim için son tüketiciye ulaşana kadar toplu tüketim yerlerinde, büfe ve kantinlerde de virusla kontamine olabilir. Bu tür bulaşmanın en önemli kaynağı infekte gıda çalışanlarıdır. Kontamine ürünler çoğunlukla pişirildikten sonra uygunsuz bir şekilde işlenen tüketime hazır çiğ yiyecekler veya pişmiş yiyecekler olmuştur (Berger ve ark, 2010; Lynch ve ark, 2009). Belgelenmiş çoğu gıda kaynaklı viral salgınların, endüstriyel olarak işlenmiş gıdalardan ziyade elle işlenen yiyeceklerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Koopmans ve Duizer, 2004). Kişisel hijyen kurallarına uymayan bir gıda çalışanı fekal-oral yolla bulaşmaya zemin hazırlayacak şekilde gıda ürünlerini kontamine edebilir. Aynı zamanda kusma sonucu gıda veya gıdanın işlendiği mutfakta bulunan tezgah, lavabo, bıçak gibi ekipmanların virusa maruz kalmasıyla gıdaların çapraz kontaminasyonu meydana gelebilir. Bir dizi salgın, infekte gıda çalışanının kusmuğundan taze ürünlerin kontaminasyonuna bağlanmıştır (Caul ve ark, 1993). Kusma sırasında en az $2\text{-}3x10^{7}$ norovirus partikülünün saçıldığı öne sürülmüştür (Reid ve ark. 1988; Caul 1994). Doğrudan bulaşmanın yanı sıra, kusma ile üretilen aerosollere maruz kalan yiyeceklerin ve mutfak yüzeylerinin kontamine olabileceği bildirilmiştir (Seymour ve Appleton., 2001). Gıda kaynaklı viruslarla infekte olan bir bireyde semptomlar başlamadan önce veya semptomlar sona erdikten sonra virus saçılımı gerçekleşebilir. Bu durum, gıda işletmelerinde yetersiz kişisel hijyeni sonucunda görülen bazı salgınları açıklayabilir. Bu işletmelerde çalışan kontaminasyon kaynağı kişilerin hiçbir semptom göstermemelerine rağmen büyük miktarlarda virus saçabildiği bildirilmiştir (Smulders ve ark., 2013).

2.1.1. Gıda Kaynaklı Virusların Yaygınlığı

Dünyanın birçok yerinde gıda kaynaklı virusların yol açtığı salgınlar rapor edilmiştir. CDC verilerine göre ABD'de gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık %58'ine (5.5 milyon), hastaneye yatışların %26'sına ve ölümlerin %11'ine virusların neden olduğu bildirilmiştir (Scallan ve ark., 2011). EFSA verilerine göre ise Avrupa'da viral

ajanların, 2006 yılında gıda kaynaklı oluşan insan vakalarının %11,8‘inden sorumlu olduğu bildirilmiştir; 2017 yılında ise bu oran %19,7 olarak gösterilmiştir. (EFSA, 2011, EFSA, 2018). Araştırmacılar gıda kaynaklı virusların önemini ortaya koymak için salgınlar ile bağlantılı çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmaların bazıları salgından etkilenen insanlardan gıda kaynaklı virusun tespitine yönelik olmuş, bazılarında ise salgından önce tüketilen yiyeceklerin virusla kontamine olup olmadığını ortaya koymak için yapılmıştır. Bazı durumlarda ise herhangi bir salgından bağımsız olarak risk grubunu oluşturan yiyecek grubunu belirlemek için gıdalarda bu virusların varlığı araştırılmıştır.

2.1.1.1. Tüketime Sunulan Gıda Ürünlerinde Virusların Varlığı

Gıda kaynaklı virusların genellikle sporadik vakaların oluşmasına neden olmasının yanı sıra, son yıllarda salgınlar şeklinde görülmesi araştırıcıları salgın çıkmadan önce riskli gıdaların belirlenmesine yönelik araştırmalara yöneltmiştir.

Astroviruslar kabuklu deniz hayvanlarında RT-PCR ve hibridizasyon yöntemi ile tespit edilmiştir (Le Guyader ve ark., 2000). Norveç kıyılarından alınan kabuklu deniz ürünleri örneklerinin %18,6'sında adenovirus tespit edilmiştir (Myrmel ve ark., 2004).

Enteroviruslar, özellikle istiridye olmak üzere kabuklu deniz ürünleri örneklerinden sıklıkla izole edilmiştir. Kontamine olmuş örneklerin sayısı %19 ile %63 arasında değişmiştir (Le Guyader ve ark., 1993, 1994; Beuret ve ark., 2003; Muniain-Mujika ve ark., 2003).

Kanada‘da yapılan bir çalışmada tarlada yetiştirilen ve yakınlarda bir nehirden sağlanan suyla sulanan çileklerde domuz hepatit E virusu, norovirus GI grubu ve insan rotavirusu moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir (Brassard ve ark., 2012).

Rotaviruslar, marulda gram başına 10.000 virion konsantrasyonunda bulunmuştur. Muhtemel kontaminasyon kaynağı olarak, sebzeleri yıkamak için kullanılan güvenli olmayan su olduğu bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 1997).

Türkiye‘de yapılan ilk gıda kaynaklı hepatit A virus araştırmasında RT-nested-PCR ile yapılan analizlerde 15 dondurulmuş midye örneğinden 5'i, denizden toplanan 23 midye örneğinden 3'ü ve satış yerlerinden toplanan 35 taze midye örneğinden 15'i hepatit A virusu yönünden pozitif bulunmuştur (Çiftçioğlu ve ark., 2007).

İstanbul‘da domates, maydanoz, yeşil soğan, marul, karışık salata örneklerinden 525 adet gıda numunesi toplanmış ve norovirus yönünden real-time RT-PCR ile analiz edilmiştir. Bir yeşil soğan ve 1 domates numunesinin norovirus GII grubu yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2011).

İstanbul‘un boğaziçi bölgesinden toplanan midye örnekleri norovirus GI ve GII yönünden incelenmiş 110 örnek grubunun %4,5‘i norovirus genogrup II yönünden pozitif bulunmuştur (Yılmaz ve ark., 2010).

İstanbul‘un boğaziçi bölgesinden toplanan midye örnekleri hepatit A ve hepatit E yönünden incelenmiş ve 92 örnek grubunun 3 tanesi hepatit A virusu yönünden pozitif bulunmuştur. Hepatit E virusu yönünden pozitif örnek bulunmamıştır (Yılmaz ve ark., 2018).

İstanbul‘da yapılan bir çalışmada 52 grup (1350 adet) midye örneği multiplex real-time PCR yöntemi ile adenovirus, rotavirus ve astrovirusun varlığı yönünden araştırılmıştır. İncelenen örneklerin %46,15‘inde adenovirus, %63,46‘sında astrovirus, %40,38‘inde hem adenovirus hem de astrovirus saptanmıştır. Bu çalışmada incelenen hiçbir midye örneğinde rotavirus varlığı saptanmamıştır (Ghalyoun ve Ünver Alçay, 2018).

2.1.1.2. Ġnsanlarda Kontamine Gıdaların Tüketilmesiyle OluÇan Vakalar

Yapılan araştırmalarda gıda kaynaklı virusların hastalardan tespitinin yanısıra, vakaların tüketilen kontamine gıdalardan kaynaklandığı saptanmış ve bu salgınlarla ilişkilendirilmişlerdir. Bazı vakalarda ise direkt gıda ürünüyle olmasa da infekte gıda çalışanının hijyen koşullarına uymaması sebebiyle tüketime hazır gıdayı kontamine ettiği ortaya konulmuştur.

Avusturalya‘da bir norovirus salgınında tespit edilen 97 vakadan 92'sinin hastalığa yakalanmadan önceki üç gün içinde çiğ istiridye tükettiği doğrulanmıştır. Yenen istiridye sayısıyla hastalık riskinin arttığı ve buharda pişirilen istiridyelerin bu virusları etkisiz hale getirmek ve hastalıkları önlemek için yeterli olmadığı bildirilmiştir (Kirkland ve ark., 1996).

Texas Üniversitesi'ndeki (ABD) öğrenciler arasında noroviruslarla ilişkili bir akut gastroenterit salgını tespit edilmiştir. Bu salgında 18 hasta öğrencinin 9'unun (%50) dışkı örneklerinde ve üniversitenin kafeteryasında satılan jambon örneklerinde norovirusların varlığı tespit edilmiştir. RT-PCR ile yapılan testlerde, sandviçlerin

hazırlanması sırasında yiyeceğin bir gıda çalışanı tarafından kontamine edildiği doğrulanmıştır (Daniels ve ark., 2000).

Norovirusların hayvansal gıda ve deniz mahsülleri dışında, yıkanmış salatalar (Lo ve ark., 1994), ithal edilen dondurulmuş ahududu (Ponka ve ark. 1999), lahana salatası (Currier, 1996) , yeşil salatalar (Griffin ve ark., 1982), taze kesilmiş meyveler (Herwaldt ve ark., 1994) ve patates salatası (Patterson ve ark., 1997) gibi çeşitli taze ürünlerle epidemiyolojik olarak ilişkilendirildiği salgınlar rapor edilmiştir. Bu salgınların birinde bir gıda çalışanının bir lavaboya kustuğu, ertesi gün, klor bazlı bir dezenfektanla temizlenen lavabonun, salata yıkamak için kullanıldığı ve bu kontaminasyona bağlı noroviruslarla bağlantılı bir gastroenterit salgını ortaya çıktığı bildirilmiştir (Patterson ve ark., 1997).

Restoran kaynaklı bir norovirus salgınında, restoranda bir gıda çalışanının elinden, kullanılan bıçağın sapından ve tuvalette klozet kapağından alınan sürüntü örneklerinin norovirus yönünden pozitif olduğu ve yapılan sekans analiziyle birbiriyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Boxman ve ark., 2011).

1988'de Çin‘in Şangay şehrinde hepatit A virusu ile kontamine çiğ istiridye tüketimiyle ilişkili büyük bir hepatit A salgını meydana gelmiş ve 300.000'den fazla vaka bildirilmiştir; bunların 47'si (% 0.015) ölümle sonuçlanmıştır (Cooksley ve ark., 2000).

Güney İtalya‘da meydana gelen bir salgında, moleküler incelemeler ile bir gıda işletmecisi ile ilişkili 26 hepatit A vakası tespit edilmiştir. (Chironna ve ark., 2004).

Dondurulmuş ahududularla ilişkili bir hepatit A virusu salgınında infeksiyon, ahududuların yetiştirildiği çiftlikte bir meyve toplayıcısından kaynaklandığı bildirilmiştir (Ramsay ve Upton, 1989).

Fransa‘da 2009-2010 yıllarında 59 hepatit A vakasının meydana gelmesiyle virusun kurutulmuş domateslerden kaynaklandığı ve ürünlerin Türkiye‘den ithal edildiği bildirilmiştir (Gallot ve ark., 2011).

2003 yılında bir kruvaziyer gemisinde meydana gelen akut gastroenterit salgınında hastalardan alınan örnekler RT-PCR ile incelendiğinde norovirus, sapovirus ve rotavirus varlığı değişik hastalarda tespit edilmiştir. Gemide bulunan yolcuların son 2 günde tükettiği yiyecekler incelendiğinde hastalık belirtisi gösteren kişilerin diğer yolculara oranla daha fazla salata ürünleri tükettiği belirlenmiş ve mevcut gastroenterit vakasının kaynağı salata ürünleriyle ilişkilendirilmiştir (Gallimore ve ark., 2005).

Japonya‘nın bazı bölgelerindeki okullarda akut gastroenterit vakası görülmüş ve yapılan çalışmalar öğle yemeklerinden kaynaklanabilecek rotavirus bağlantılı bir vaka olarak tanımlanmıştır (Hara ve ark., 1978). Yine Japonya‘nın Fukui kentinde bulunan 7 ilkokulda 3000 kişinin etkilendiği benzer bir gastroenterit vakasının kaynağının C grubu rotavirus olduğu belirlenmiştir. Herhangi bir gıda maddesinde ve su örneğinde virusun saptanamamasına rağmen 7 okula da tek bir yerden öğle yemeği dağıtıldığı için virusun gıda kaynaklı olduğu yorumu yapılmıştır (Matsumoto ve ark., 1989).

Almanya‘da bir anne-çocuk sanatoryumunda meydana gelen rotavirus salgınında tesisin mutfağından alınan 74 adet gıda numunesi rotavirus yönünden test edilmiştir. Bu çalışmada patates salatasında rotavirusun varlığı RT-seminested-PCR ile tespit edilmiş ve hasta bir çocuğun dışkı numunesinde bulunan rotavirus ile sekans analizi yapılıp virusların aynı genetik karaktere sahip olduğu belirlenmiştir (Mayr ve ark., 2009).

Kaynamamış keçi sütü tüketiminden sonra Slovakya'da bir ailede TBE salgını tespit edilmiştir (Kohl ve ark. 1996). Rusya'da meydana gelen benzer bir TBE vakası çiğ inek sütünün içilmesi sonucu gelişmiştir (Vereta ve ark., 1991).

2.1.1.3. Ülkemizde Görülen Virus Kaynaklı Salgınlar

Ülkemizin çeşitli bölgelerinden virus kaynaklı salgınlar rapor edilmiştir.

2008 yılında Aksaray‘da 13.800 kişinin gastroenterit bulgularıyla hastaneye başvurusu sonrasında incelenen örneklerden norovirus saptanmış ve Türkiye‘de ilk kez norovirus salgınının varlığı bildirilmiştir (Uyar ve ark., 2008).

Tokat‘ın Erbaa ilçesinde 2009 yılında norovirusa bağlı ishal salgınlarının ortaya çıktığı ve 5000 kisinin etkilendiği bildirilmiştir (Serpen A., 2009).

Afyonkarahisar Kocaöz Kasabası‘nda 2013 yılında Ocak-Haziran ayları arasında toplam 71 kişide hepatit A vakası görülmesi nedeniyle bu durum bir salgın olarak değerlendirilmiştir. Vakalar kötü hijyen koşullarına bağlanmıştır (Avcı ve ark., 2013).

Kahramanmaraş‘ın Elbistan ilçesinde gastroenterit semptomlarıyla hastaneye başvuruların artması sonucu yapılan araştırmada hastalardan ve bölgenin su kaynağından alınan örneklerde norovirus saptanmıştır (Şahan ve ark., 2017).

Kütahya‘nın Tavşanlı ilçesinde 684 kişinin etkilendiği bir gastroenterit salgınında hastalardan alınan dışkı örneklerinin 5‘inde norovirus saptanmıştır (Barlas ve ark., 2014).

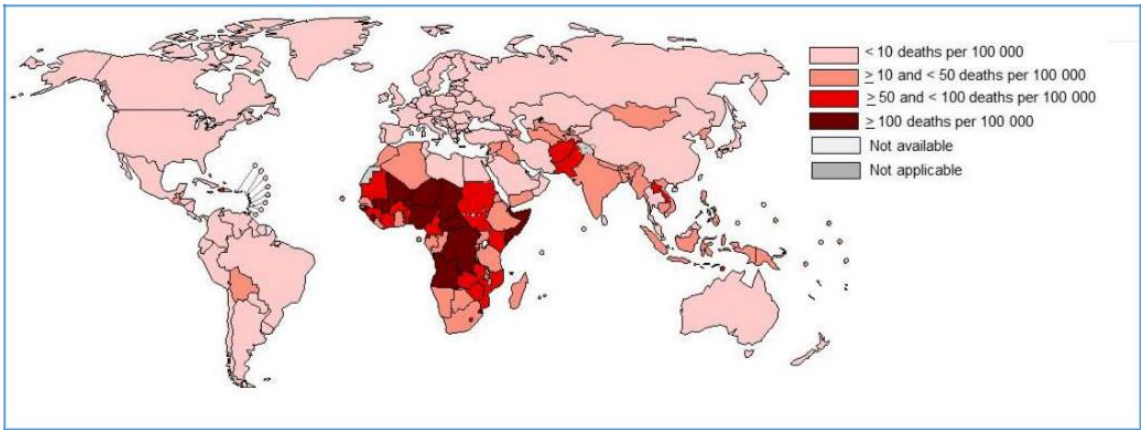
Trabzon‘un Sürmene ilçesinde 2010 yılında 2483 kişinin etkilendiği bir salgın meydana gelmiş ve yapılan araştırmada etkenin kontamine su kaynaklı norovirustan kaynaklandığı bildirilmiştir (Çan ve ark., 2011).

Malatya‘da 2005 yılında meydana gelen bir salgın retrospektif olarak incelenmiş, salgının yaşandığı Kasım, Aralık aylarında ishal şikayetiyle hastaneye başvuran 9907 kişiden 2274‘ünün bilgileri incelenmiştir. Devlet ve Üniversite hastanelerine başvuran kişilerin yarısının dışkı örneklerinde rotavirusun latex aglutinasyon yöntemiyle saptandığı bildirilmiştir (Pehlivan ve ark., 2009).

2.2. Rotavirusun Epidemiyolojisi

2.2.1. Ġnsanlarda Rotavirus Ġnfeksiyonu

Her yaştan kişiler rotavirus infeksiyonlarına duyarlıdır. 5 yaş altı çocuklar ve immun sistemi baskılanmış insanlarda infeksiyon daha şiddetli seyretmektedir. 5 yaş altı çocuklarda akut gastroenteritlerin en yaygın nedeni rotavirustur (Parashar ve ark., 2009; Tate ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar 5 yaş altı çocukların %95‘inin rotavirus yönünden seropozitif olduğunu ortaya koymuştur (Velazquez ve ark., 1996; Glass ve ark. 1996). Aynı zamanda infeksiyon geçiren bireylerin %30‘u aynı anda en az 2 değişik rotavirus suşuyla infekte olmaktadır (Tcheremenskaia ve ark., 2007). 2008 yılında dünya genelinde rotavirus infeksiyonuna bağlı ishal, 5 yaş altı 453.000 çocuğun ölümüyle sonuçlanmıştır. Bu sayı ishale bağlı ölümlerin %37'si ve 5 yaşından küçük çocuklarda görülen tüm ölümlerin %5'ini oluşturmaktadır (Tate ve ark. 2012). Rotavirusun görülme sıklığı incelendiğinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin arasında önemli bir fark görülmemektedir. Bununla birlikte gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş olan ülkelere nazaran ölüm oranları hayli yüksektir. Ölümcül rotavirus infeksiyonlarının %80'inden fazlası, zayıf hijyen ve sanitasyon, yetersiz beslenme sorunlarının bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde meydana gelir (Parashar ve ark., 2003, 2006). Rotavirus kaynaklı ölümcül vakaların %50'den fazlası sadece beş ülkede ortaya çıkmaktadır: Hindistan (%22), Nijerya (%9), Pakistan (%9), Demokratik Kongo Cumhuriyeti (%7) ve Etiyopya (%6). Ölümcül akut gastroenterit vakaları gelişmiş ülkelerde ise çok nadir görülür (Tate ve ark., 2012). 2013 yılında rotavirusa bağlı çocuk ölümlerinin dünyadaki dağılımı Şekil 1‘de verilmiştir.



Şekil 1: 2013 yılında rotavirusa bağlı 5 yaş altı çocuk ölümleri dağılımı (DSÖ,2016)

Rotavirusun çok az bir miktarı insanlarda infeksiyon oluşturmak için yeterlidir. Dışkının gramında 10^{10} virus partikülü bulunmaktadır ve homolog bir konakçının infeksiyonu için 10 partikül yeterlidir (Greenberg ve Estes, 2009).

İnsanlar A, B ve C grubu rotaviruslar ile infeksiyona duyarlıdır. Bu grupların içinde A grubu rotavirus, dünya çapında tıbbi açıdan en önemli olan türdür (Doro ve ark., 2014). Yaşamın ilk 3 ayında infeksiyonlar, muhtemelen maternal antikorlar sayesinde korunma nedeniyle genellikle daha hafiftir. 4-23 aylık çocuklar, hastaneye yatmayı da içerebilecek ağır rotavirus infeksiyonları açısından risk grubu içerisindedir. Bağışıklık durumunun bu yaşta yeterli olmaması sebebiyle tekrarlanan infeksiyonlar sıklıkla ortaya çıkar. Rotavirusa karşı bağışıklık sonraki her infeksiyonda aşamalı olarak artar ve bu nedenle semptomlar reinfeksiyonlarda daha hafif seyreder (Velazquez ve ark., 1996; Gladstone ve ark., 2011). Sonuç olarak, rotavirus yetişkinlerde infeksiyon oluşturabilmesine rağmen, hastalık genellikle subklinik veya hafif seyirlidir (Estes ve Kapikian, 2007).

Rotavirus, diğer birçok enterik patojenden daha şiddetli gastroenterite neden olur. Bu nedenle, hastalarda tespit edilen rotavirus infeksiyonu oranı, gastroenterit şiddetinin artmasıyla artar. Bu oranlar, tüm ishal ataklarının %8-10'u iken hastaneye yatmayı gerektiren ishal ataklarının neredeyse %35-40'ı arasındadır (Tate ve ark., 2012; Lanata ve ark.,2013).

Her ne kadar A grubu rotavirus en çok infeksiyon oluşturan grup olsa da diğer rotavirus grupları da sporadik vakalara neden olduğu gibi büyük salgınlara da yol

açmıştır. Örneğin 1980'de, Çin'de B grubu rotavirus ile kontamine olan su kaynağı ile oluşan salgında 1 milyon insan etkilenmiştir (Tao ve ark., 1984). Hindistan'da 2006-2014 yılları arasında oluşan sporadik vakaların %0,7 ve salgınların %8,6'sının C grubu rotavirustan kaynaklandığı bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2017).

A grubu rotaviruslar, memelilerin birçok türünde ve kanatlı hayvanlarda tespit edilmiştir (Tablo 1). Rotavirus B, C, H ve I gruplarının memelilerde görüldüğü bildirilirken; D, F ve G grupları sadece kanatlı hayvanlarda bildirilmiştir (Mihalov-Kovács ve ark.,2015).

Tablo 1: **A grubu rotaviruslarının G(VP7) ve P(VP4) genotipleri ile bunların görüldüğü konakçılar**

G	İnsan	Hayvan Türü	P	İnsan	Hayvan Türü
1	+	Domuz	1	+	İnek, Keçi, Guanako, Rhesus
2	+	Domuz	2	+	Maymun
3	+	Maymun, Kedi, Köpek, İnek, Tavşan, Alpaka, Sıçan, Yarasa	3	+	Maymun, Kedi, Köpek, Sıçan Yarasa
4	+	Domuz	4	+	
5	+	Domuz	5		İnek,
6	+	İnek	6	+	Domuz, Yarasa
7		Hindi	7		İnek, Domuz,
8	+	Guanako, Rhesus, İnek,	8	+	
9	+	Domuz	9	+	Kedi,
10	+	İnek, Koyun, Deve	10	+	
11	+	Domuz,	11	+	İnek, Deve
12	+		12		At
13		At	13	+	
14		At,	14	+	Tavşan, Koyun, Vikunya,
15		İnek	15		Koyun, Deve
16		Fare	16		Fare
17		Hindi	17		Hindi, Güvercin, Ördek, Tilki, Rakun
18		Güvercin, Ördek, Tilki	18		At

19		Tavuk	19	+	
20	+		20		Fare
21		İnek	21		İnek
22		Hindi	22		Tavşan
23		Sülün	23		Domuz
24		İnek	24		Rhesus(Maymun)
25		Yarasa	25	+	
26		Domuz	26		Domuz
27		Uçan Kuskus	27		Domuz
28		Martı	28	+	
29	+		29		İnek
30		Yarasa	30		Tavuk
31		Yarasa	31		Tavuk
32		Sivri fare	32		Domuz
33		Yarasa	33		İnek
34		Rakun	34		Domuz
35		Alpaka	35		Hindi
36		Yarasa	36		Uçan Kuskus
			37		Sülün
			38		Hindi
			39		Martı
			40		Alpaka
			41	+	
			42		Yarasa
			43		Yarasa
			44		Yarasa
			45		Sıçan
			46		Sivri fare
			47		Yarasa
			48		Yarasa
			49		Domuz
			50		Alpaka
			51		Yarasa

- G28-G36 arasındaki G genotipleri ile, P38-P51 arasındaki P genotipleri Rotavirus Sınıflandırma Çalışma Grubu (Rotavirus Classification Working Group - RCWG) tarafından önerilmiştir. (RCWG, 2020)

2.2.2. Hayvanlarda Rotavirus Ġnfeksiyonları

Rotavirusun hayvanlarda da yaygın olarak infeksiyon oluşturması dünyada hem domuz çiftlikleri, atçılık, tavukçuluk ve sığırcılık işletmelerinde ekonomik kayıplara yol açmış hem de köpek, kedi gibi evcil hayvanları etkileyen önemli bir sorun olmuştur. (Dhama ve ark., 2009; Vlasova ve ark., 2020).

Tavuk sürülerinde hastalık, hafif ila şiddetli ishal, dehidrasyon, yavaş kilo alımı, artan ölüm oranı belirtileriyle kendini gösterir. ABD'de 2005–2006 yıllarında yapılan büyük ölçekli bir araştırmada, RT-PCR ile A grubu rotaviruslar tavuk sürülerinin %46,5'inde ve hindi sürülerinin %69,7'sinde tespit edilmiştir (Pantin-Jackwood ve ark, 2008). Tavuklarda D grubu rotavirusların varlığı da İskoçya, İsveç, Almanya, Birleşik Krallık, İtalya, Hollanda ve Mısır gibi birçok ülkede bildirilmiştir (Otto ve ark., 2012; Hemida, 2013). 2012 yılında Brezilya'da D grubu rotavirusun tavuk çiftliklerinde görülme oranı %53 olarak bildirilmiştir (Bezerra ve ark., 2014). Ülkemizde bildiğimiz kadarı ile avian rotavirusların varlığı ile ilgili bir bildirim yapılmamıştır.

Neonatal buzağı ishallerinin önemli bir etkeni olan rotaviruslar, virusla kontamine olmuş süt, su ve yem malzemelerine maruz kalmış yenidoğan buzağılarda ishale neden olmaktadır. İnfekte hayvanlar dışkı yoluyla yüksek konsantrasyonda virusu saçarlar. Çok düşük dozlarda virus yükü infeksiyonu oluşturmak için yeterli olduğundan minimum çevresel kontaminasyon buzağılarda yaygın infeksiyona neden olabilmektedir (Holland, 1990).

Buzağılarda rotavirus ishali, 12-24 saat gibi çok kısa bir inkübasyon süresine sahiptir. Genellikle ateş görülmez, ikincil patojenler ile komplike olunca hastalık seyri şiddetlenir. Yenidoğan buzağılarda rotavirusa bağlı ölüm oranının çoğunlukla %5-20 civarında olduğu belirtilmektedir ancak bu oranın %80'e kadar çıkabileceği bildirilmiştir (Dhama ve ark., 2009). Bununla birlikte, yetersiz miktarda kolostrum almış ve stresli koşullar altında olan buzağılarda ölüm oranı daha yüksek olabilir. Etkilenen buzağılarda depresif bir eğilimin yanı sıra şiddetli ishal, dehidrasyon ve iştahsızlık görülür (Murphy ve ark., 1999). İshalli dışkıda, ikincil bakteri infeksiyonu olmadıkça genellikle kan veya mukus görülmez. Tekrarlanan ishal nöbetleri, genellikle geç gelişmeye neden olur veya ciddi dehidrasyon nedeniyle ölüm meydana gelir; daha az sıvı rezervine sahip olan yeni doğan buzağılar daha savunmasız hale gelir (Murphy ve ark. 1999).

A, B ve C grubu rotavirusların sığırlarda ishale neden olduğu bildirilmiştir. A grubu rotaviruslar sığır türlerindeki infeksiyonların çoğundan sorumludur (Vlasova ve

ark., 2020). Virus, ahırda dışkı içinde birkaç ay infeksiyöz etkisini korur; ve birçok dezenfektana dirençli olması etkenin uzun süre çevrede kalmasına katkıda bulunur (Murphy ve ark. 1999).

Atlarda rotavirus 3 aylıktan küçük tayların dehidre ishalinin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (Badaracco ve ark., 2014). Atlarda sadece A grubu rotaviruslar tespit edilmiştir (Browning ve ark, 1991). Genç taylar, A grubu rotavirus infeksiyonuna karşı oldukça hassastır ve özellikle pasif antikor aktarımı başarısız olan yenidoğanlarda infeksiyon şiddetli seyreder. A grubu rotavirus infeksiyonları, taylarda görülen ishal vakalarının % 50-90'ından sorumludur (Browning ve ark., 1996; Papp ve ark, 2013). Yetişkin yaşına gelindiğinde, rotavirusa özgü antikorlar çoğu atta saptanabilir (Conner ve ark., 1980). Tipik olarak, rotavirusların neden olduğu hastalık, bol sulu ishal, dehidrasyon, anoreksi, karın ağrısı ve depresyon ile kendini gösterir (Badaracco ve ark., 2014). Hastalık kendi kendini sınırlandırsa da dehidrasyon, özellikle genç taylarda ölümcül olabilir (Collins ve ark., 2008). Dünya genelinde yapılan moleküler epidemiyolojik araştırmalarda at rotavirusları içinde bildirilen en yaygın rotavirus genotipinin G3P[12] ve G14P[12] olduğu bildirilmiştir (Ciarlet ve ark. 1994; Van der Heide ve ark., 2005).

2.3. Etiyoloji

2.3.1. Tarihçesi

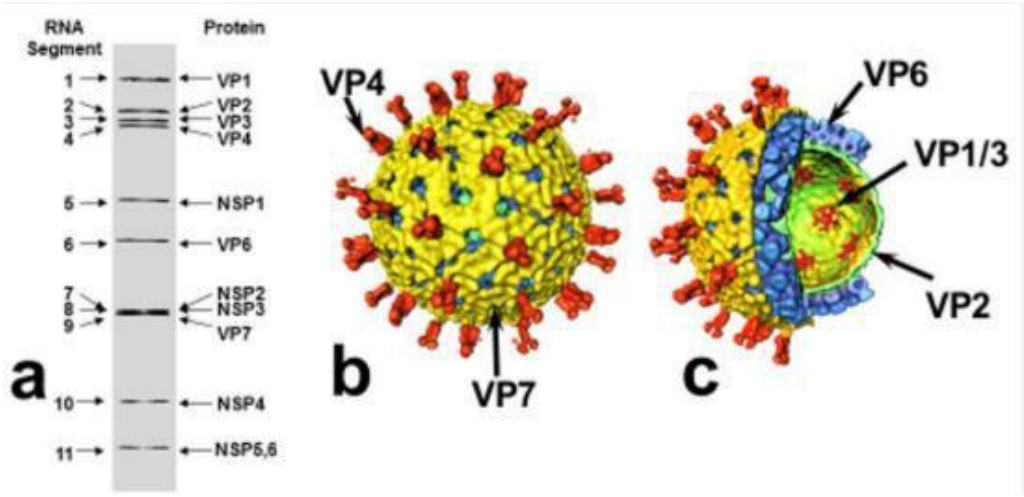
Rotavirus infeksiyonu ilk olarak 1963 yılında farelerde belirlenmiş ve bundan kısa bir süre sonra SA11 (maymun ajanı 11) rotavirus suşu sağlıklı bir vervet maymundan izole edilmiştir (Vlasova ve ark., 2020). 1969'da A grubu sığır rotavirusu hücre kültüründe izole edilmiş ve buzağı ishallerine neden olan bir etken olduğu doğrulanmıştır (Mebus ve ark. 1971). Murin, maymun ve sığır rotaviruslarının daha sonra ortak bir antijenik grubu (VP6) paylaştığı ve morfolojik olarak ayırt edilemez olduğu bildirilmiştir (Vlasova ve ark., 2020). İnsan rotavirusu kısa bir süre sonra, Bishop ve ark. (1973) tarafından akut gastroenteritli çocukların bağırsak mukozasında ve dışkı örneklerinde elektron mikroskopu ile yapılan incelemeler sonucu tekerlek şeklindeki partiküllerin olduğu belirtilmiştir. Rotavirus, elektron mikroskobu ile gözlemlendiğinde tekerlek gibi göründüğü için Latincede tekerlek anlamına gelen _rota‘ kelimesinden türetilerek rotavirus ismi önerilmiştir (Flewett ve ark, 1974). Sonrasında

teşhis metotlarında oluşturulan ilerlemeler, özellikle dışkı örneklerinden doğrudan antijen saptamasına dayanan metotlar rotavirusların bebeklerde ve küçük çocuklarda gastroenteritin önemli bir nedeni olarak tanımlanmasını sağlamıştır (Kapikian et al., 1996).

2.3.2. Rotavirusun Yapısı

Rotaviruslar, *Reoviridae* familyasına ait olan zarfsız, çift iplikli RNA (dsRNA) viruslarıdır. Elektron mikroskobunda tekerlek benzeri parçacıklar şeklinde morfolojik yapısından dolayı bu ismi almışlardır. Olgun virus partikülü, ikozahedral simetriye sahiptir ve spike proteini dahil olarak yaklaşık 100nm bir çapa sahiptir. Viral genom, yapısal destek sağlayan ve hücre girişine aracılık eden altı yapısal protein (VP) ve altı yapısal olmayan protein (NSP) olmak üzere 12 proteini kodlayan 11 segmente sahip dsRNA yapısına sahiptir (Estes ve ark., 2007; Desselberger ve ark., 2009). 11. segment hariç, diğer her segment bir proteini kodlar. 11. segment hem NSP5 hem de NSP6 proteinlerini kodlar. Virionu oluşturan 6 yapısal protein VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 ve VP7'dir. Yapısal olmayan proteinler ise NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 ve NSP6'dır. (Greenberg ve Estes, 2009).

Yapısal olmayan proteinler sadece infekte olmuş hücreler içerisinde üretilir. Viral replikasyon siklusunda görev alırlar ve patogenez oluşumunu veya infeksiyona karşı immun yanıtı etkilemek için konak proteinlerle etkileşime girerler (Angel ve ark, 2007). NSP1'in birçok doğal immun savunma mekanizmasına karşı koyarak virusun virulansında büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir. NSP2 ve NSP5, viroplasmanın bileşenleridir; NSP5 viroplasmaya spesifik proteinlerin alınmasında görev alır (Fabbretti ve ark, 1999; Contin ve ark., 2010). NSP3 konakçı hücrenin RNA translasyon mekanizmasını durdurarak viral RNA translasyonunu organize eder (Dutta ve ark., 2011). NSP4, ishali oluşturan ve virusun bağırsak boyunca yayılmasını destekleyen bir enterotoksin görevi görür, bu mekanizmayla ilgili çalışmalar devam etmektedir (Yang ve ark., 2012). NSP4 çift katmanlı partikülün bağlandığı transmembran endoplazmik reticulum (ER) reseptörü olarak görev yapar ve virionun son tabakasını elde etmek için ER'den tomurcuklamayı başlatır. NSP6'nin, NSP5'in viroplasma yapısındaki oluşumunu organize ettiği ve infeksiyon sırasında mitokondriyal fonksiyonu düzenlediği düşünülmektedir (Raimsford ve ark., 2007; Holloway ve ark. 2015).



Şekil 2: Rotavirusun yapısal organizasyonu.

(a) SDS-PAGE ile rotavirus dsRNA migrasyon modeli (SA11 suşu). (b) Yüzey görünümü ve (c) rotavirus yapısının kesit alanı: VP4 spike proteinleri (kırmızı), VP7 dış katman (sarı), VP6 orta katman (mavi), VP2 iç (çekirdek) katman (yeşil), VP1 / VP3 kompleksleri, VP2 katmanının (kırmızı) içine eklenmiştir. **(**Desselberger, U. , 2017).

İnfektif virion, genomu çevreleyen ve koruyan üç protein tabakasından oluşur. İç katman veya çekirdek VP2'nin 120 kopyası tarafından oluşturulur, dsRNA'nın her segmentine bağlanmış vaziyette VP1 (RNA'ya bağımlı RNA-polimeraz) ve VP3 (guanylyltransferase ve metilaz) bulunur, her iki protein de genom transkripsiyonunda rol oynar (Angel ve ark., 2007). Orta tabaka, çekirdeği çevreleyen pentamerler ve heksamerler olarak organize edilen VP6'dan oluşur. Bileşiklerin kapside girişinde ve yeni oluşturulmuş mRNA'ların çıkışında önemli bir rol oynarlar. VP6, en çok bulunan yapısal protein olup, non-infeksiyoz fakat transkripsiyonel olarak aktif olan çift katmanlı partikülleri (double-layered particles, DLPs) oluşturmaktadırlar. İnfeksiyöz üç katmanlı partikülün (triple-layered particles, TLPs) bir parçası olan en dış tabaka, virionun pürüzsüz yüzeyini oluşturan kalsiyum bağlayıcı glikoprotein VP7'den ve infeksiyon sırasında hücreye bağlanma görevindeki proteaza duyarlı VP4 spike proteinlerinden oluşur (Parashar ve ark., 2006).

Tablo 2: Rotavirusun proteinleri, fonksiyonları ve genotip özellikleri (Estes ve Greenberg; 2013):

Gen Seg.	Protein	Fonksiyon	Genotip İsmi
1	VP1	RNA bağımlı RNA polimeraz, ssRNA bağlanması, VP3 ile kompleks	RNA dependent RNA polymerase
2	VP2	VP1'in replikaz aktivitesi için gereklidir, RNA bağlanması	Core protein
3	VP3	Guanyltransferase, methyltransferase, ss RNA bağlanması, VP1 ile kompleks	Methyltransferase
4	VP4	P-type nötralizasyon antijeni, viral bağlanma, homotrimer, proteaz ile sağlanmış enfektivite, virülans, kabul edilen füzyon bölgesi	Protease sensitive
5	NSP1	İnterferon antagonisti, kabul edilen viral E3 ligaz, RNA bağlanması	Interferon Antagonist
6	VP6	Subgrup antijeni, trimer, koruma, transkripsiyon için gerekli	Inner capsid
7	NSP3	Asidik dimer, PABP'nin yerine geçer, hücresel elF4G, Hsp90, viral mRNA'larının 3' ucuna bağlanır, konakçı translasyonunu inhibe eder	Translation enhancer
8	NSP2	Bazik, oktamer, RNA bağlayıcı, NTPaz, NDP kinaz	NTPase
9	VP7	G-type nötralizasyon antijeni, glikoprotein kalsiyum bağımlı trimer	Glycosylated
10	NSP4	RER transmembran glikoproteini, viroporin, DLP'ler için hücre içi reseptör, TLP'lerin morfogenezinde görevli, viroplazmalar ve Otofajide etkili, RNA replikasyonunu ve hücre içi kalsiyum modüle eder, hücrelerden salgılanan enterotoksin, virülansı etkiler	Enterotoxin
11	NSP5	Bazik, fosfoprotein, RNA bağlayıcı, protein kinaz, NSP2 ile viroplazmalar oluşturur, VP2 ve NSP6 ile etkileşime girer	Phosphoprotein
	NSP6	NSP5 ile etkileşir, viroplazmalar ve çoğu virus suşunda bulunur, RNA bağlanmasında görev alır	

2.3.3. Rotavirusun Sınıflandırması

2.3.3.1. Antijenik özelliklerine göre sınıflandırma

Rotaviruslar, yüksek bir genomik ve antijenik çeşitliliğe sahiptir dolayısıyla üç farklı özellikte sınıflandırılır: grup, alt grup ve serotip (Franco ve ark., 2006). Major kapsid viral protein olan VP6 proteinin serolojik aktivitesi ve genetik değişkenliğine göre, tür olarak da adlandırılan en az 8 farklı grup ile adlandırılır (Rotavirus A, Rotavirus B, .. Rotavirus I). A, B ve C gruplarına ait rotaviruslar, insan ve hayvan infeksiyonlarında rol oynamaktadır, ancak diğer rotavirus grupları sadece hayvan konakçılarında bulunmuştur (Matthijnssens ve ark., 2012). A grubu rotaviruslar, insan infeksiyonlarında en yaygın olanıdır; bu nedenle, bu grup aşılama için uygun bir hedef olarak kabul edilir. A grubu insan rotavirusları, Wa, DS-1 ve AU-1 adlı üç ana suş üzerinden bu suşlara yakınlıklarıyla genogruplara ayrılmıştır (Flores ve ark., 1982; Nakagomi ve ark., 1989). VP6 proteininde bulunan çapraz-reaktif antijenik epitoplar da alt grup I, II, I / II ve non-I / non-II olarak sınıflandırılmıştır. Günümüzde bu sınıflandırma daha az kullanılmaktadır.

Serotip sınıflaması, VP7 ve VP4 dış kapsid proteinlerinin antijenik spesifitesine dayanır. İkili isimlendirme sistemine dayanan serotip sınıflandırmasında VP7 proteini bir glikoprotein olduğu için G serotipi, VP4 proteini proteaza duyarlı olduğu için P serotipi olarak sınıflandırılmıştır (Matthijness ve ark., 2011). A grubu rotaviruslarda şu ana kadar bildirilmiş ve Rotavirus Sınıflandırma Çalışma Grubunun (Rotavirus Classification Working Group / RCWG) bildirdiği 36 G ve 51 P genotipi vardır (Matthijnssens ve ark, 2009, Matthijnssens ve ark., 2011; RCWG, 2020) ve çok sayıda G ve P kombinasyonu üretilebilir (Nakagomi ve Nakagomi, 2009). G serotipleri ile G genotipleri arasında mutlak bir ilişki tanımlanabilmişken, P serotipleri ve P genotipleri arasında kesin bir ilişki mevcut değildir. En az 51 P genotipi olduğu bildirilmiştir ve isimlendirmede bu sayılar parantez içinde gösterir. Örneğin, P[8] ve P[4] genotipleri P1 serotipinin iki alt tipine (P1A ve P1B) karşılık gelir. Rotavirus sınıflandırma çalışma grubunun önerdiği isimlendirme : İlk olarak, G serotipi / genotipi, bilinmiyor ise ―X‖, ardından P serotipi ve son olarak P genotipi parantez içinde gösterilir (Matthijnssens ve ark., 2011). Örneğin P1A[8], P serotip 1A‘yı ve P genotip 8‘i temsil eder (Estes ve Greenberg, 2013).

2.3.3.2. Poliakrilamid jel elektroforez görüntüsüne göre sınıflandırma

dsRNA, poliakrilamid jel elektroforezi ile ekstrakte edilebilir ve ayrılabilir. Poliakrilamid jel elektroforezinden ayrılan türlere _uzun‘, _kısa‘ ve _süper kısa‘ özelliklerde "elektroferotip" denir. RNA segmentlerinin migrasyonundaki çeşitli küçük farklılıklar saptanmıştır. İki prototip suşu Wa ve DS-1, iki farklı RNA migrasyon formunu temsil eder: jelde daha hızlı yürüyen 10. ve 11. genom segmentlerine sahip uzun elektroferotip ve jelde daha yavaş yürüyen 10. ve 11. genom segmentlerine sahip kısa elektroferotip (Kutsuzawa ve ark., 1982a). Kısa elektroferotipte; 11. genom segmentinin (NSP5 kodlayan bölge) 3‘non-coding bölgesinde birkaç yüz nükleotid inserasyonu sebebiyle orjinal 10. genom segmentinden (NSP4 kodlayan bölge) daha yavaş hareket eder ve sonuç olarak 11. Genom segmentine dönüşür (Dyall-Smith and Holmes, 1981). Şekil 2‘de SDS-PAGE analizi sonucu RNA segmentlerinin sıralanması gösterilmiştir.

2.3.3.3. Tüm segmentlerin gen dizilimine göre sınıflandırma

G ve P sınıflandırma modeli internal kapsid veya yapısal olmayan protein genlerindeki değişimleri belirlemede yetersiz olduğu için Rotavirus Sınıflandırma Çalışma Grubu (RCWG) her bir segmentin gen dizilimine göre belirlenen sınıflandırma modelini önermiştir. Bu sınıflandırma modeline göre protein dizilimi _VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5‘ şeklinde dizayn edilmekte ve sınıflandırma _Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx‘ şeklinde temsil edilmektedir. (Matthijnssens ve ark., 2008a; 2008b; 2011). Bu sınıflandırma modeline örnek olarak rotavirus aşı suşlarının genotip dizilimi Tablo 3‘te, rotavirusun proteinlerini temsil eden harfler ve genotip bilgileri Tablo 4‘te sunulmuştur.

Tablo 3: RotaTeq aÇısının bir suÇunun ve Rotarix aÇı suÇunun tüm gen segmentlerinin dizilimine göre örnek sınıflandırma modeli (Matthijnssens ve ark., 2011)

RVA/Vaccine/USA/Rotarix-RIX4414/1988/G1P1A[8]	G1 - P1A[8] - I1 - R1- C1 - M1 - A1 - N1 - T1 - E1 - H1
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7[5]	G1 - P7[5] - I2 - R2 - C2 - M1 - A3 - N2 - T6 - E2 - H3

Tablo 4: Rotavirusun genotipleri (Desselberger, 2014)

RV Protein	Genotipi tanımlayan benzer nükleotit oranı (%)	Genotip sayısı	Genotip ve kısaltması
VP7	80	27G	Glycosylated
VP4	80	37P	Protease-sensitive
VP6	85	18I	Inner capsid
VP1	83	9R	$RdRp^c$
VP2	84	9C	Core protein
VP3	81	8M	Methyltransferase
NSP1	79	19A	Interferon Antagonist
NSP2	85	10N	NTPase
NSP3	85	12T	Translation enhancer
NSP4	85	15E	Enterotoxin
NSP5	91	11H	PHosphoprotein

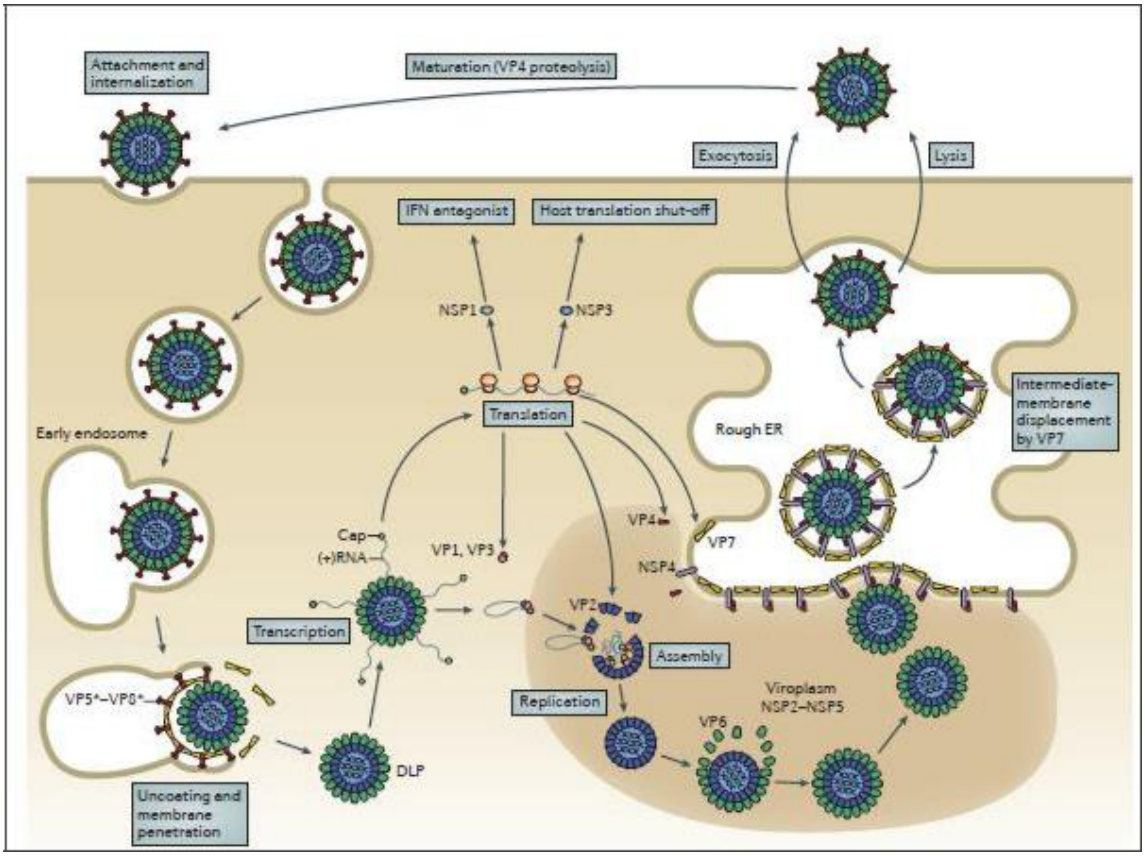
2.3.4. Rotavirusun Replikasyonu

Rotaviruslar, ince bağırsak lümeninde bulunan villusun ucundaki olgun endotel hücrelerini infekte ederler. Rotavirus replikasyon döngüsü, konakçı hücrelere bağlanma ve penetrasyon; viral mRNA ve viral proteinin sentezi; viroplazma oluşumu ve viral genom replikasyonu; virus partikül olgunlaşması ve salınımı aşamalarından oluşur (Estes ve Greenberg, 2013). Rotavirus replikasyonu, konakçı hücrenin metabolik işlevleri kullanılarak olgunlaşmış enterositlerin sitoplazmasında gerçekleşir (McDonald ve Patton, 2011). İnfeksiyondan önce VP4 spike proteini, ince bağırsakta bulunan tripsin benzeri proteazlarla VP5 ve VP8 olarak proteolitik yolla ayrılır (Estes ve ark., 1981; McDonald ve Patton, 2011). Bazı rotavirus suşları için VP8'in terminal sialik asitlere bağlanabildiği gösterilmiştir (Dormitzer ve ark., 2002). Isı şok kognat proteini 70 (HSC70), bazı gangliosidler, kolesterol ve glikosfingolipid ile zenginleştirilmiş lipit mikro bölgelerine bağlı hücre molekülleri de rotavirus reseptörleri olarak işlev görebilir (Wang ve ark., 2012; Arias ve ark., 2002). Hücreye bağlandıktan sonra rotaviruslar sitoplazmaya girmek için endositoz yolunu kullanır. Endozomlar içindeki azalmış kalsiyum konsantrasyonunun, dış kapsidin kaybını arttırdığı ve çift katmanlı viral partiküllerin (DLP) sitozole salınmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (Desselberger ve ark., 2009).

Çift katmanlı parçacıklar (DLP) VP2 ve VP6 protein katmanlarını ve transkripsiyonel olarak aktif viral polimeraz komplekslerini (VP1 ve VP3) içerir (Lawton ve ark., 1997). Burada viral mRNA transkripsiyonu başlar (Trask ve ark., 2012). DLP'lerden çıkan çok sayıda pozitif polariteli RNA molekülü 11 RNA segmentinin hepsinden kopyalanır. Yeni üretilen RNA molekülleri mRNA olarak da görev alırlar ve sitoplazmada birikirler. Replikasyon sırasında, viral proteinler bir araya toplanarak viroplazma da denilen sitoplazmik inklüzyon cisimciklerini oluştururlar. Bu süreç NSP2, NSP5 ve NSP6 proteinlerinin etkileşimi ile meydana gelir (Criglar ve ark., 2014).

Viroplazmalar, viral transkripsiyon, genom paketleme, replikasyon ve komponentlerin birleşiminin varsayılan yerleri olarak işlev görür (Eichwald ve ark., 2012; Patton ve ark.,2006). İki yapısal olmayan rotavirus proteini, NSP2 ve NSP5, RNA replikasyonu ve erken morfogenez için gerekli olan viroplazmaların ana bileşenleridir (Silvestri ve ark., 2004; Campagna ve ark., 2005). Viroplazmalar ayrıca VP1, VP2, VP3, VP6, NSP4 ve başlangıçta tüm genomik segmentlerden kopyalanan mRNA'ları içerir. NSP5 hem VP2 hem de VP1 ile etkileşime girer (Berois ve ark., 2003; Arnoldi ve ark.,2007). Viroplazmalarda oluşturulan DLP'ler VP1, VP2, VP3 ve VP6'dan oluşur ve 11 RNA segmentinden her birini içerirler. Temel virus yapısının oluşturulma sürecine pozitif polariteli tek zincirli RNA'nın farklı 11 segmenti oluşturularak, tek zincirli negatif polariteli RNA sentezi için şablon olarak kullanılırlar ve birlikte temel virionun genomunun çift zincirli RNA yapısını oluştururlar. (Fabbretti ve ark., 1999; Silvestri ve ark., 2004).

Çift katmanlı virus partikülü VP4 ve VP7 proteinlerinin oluşturulmasıyla üç katmanlı partikül haline gelir ve bu katmanın oluşması endoplazmik retikulumun içerisinde meydana gelir (Desselberger ve ark. 2009). Çift katmanlı partiküller, NSP4 ile etkileşim yoluyla endoplazmik retikulum içine alınır. NSP4, endoplazmik retikulum membrana bağlı olan ve hem VP6 bağlayıcı hem de VP4 bağlayıcı alanlara sahip olan çok fonksiyonlu bir proteindir (O'brien ve ark., 2000; Au ve ark. 1993). Endoplazmik retikulum içine girdikten sonra, VP4 ve VP7'nin çift katmanlı partikül üzerine monte edilmesini ve geçici zarfın çıkarılmasını içeren bir süreç dizisi başlatılır. Bu olgunlaşma işlemi sırasında, VP4 trimerinin uç kısmı VP7 montajından sonra takılamayacak kadar büyük olduğundan muhtemelen dış kapsit oluşurken önce VP4 sonra da VP7 viral partikül ile birleştirilir (Trask ve ark., 2012)



Şekil 3: Rotavirus replikasyon Şeması (Trask ve ark., 2012)

2.4. Rotavirusun Patogenezi ve Klinik Belirtiler

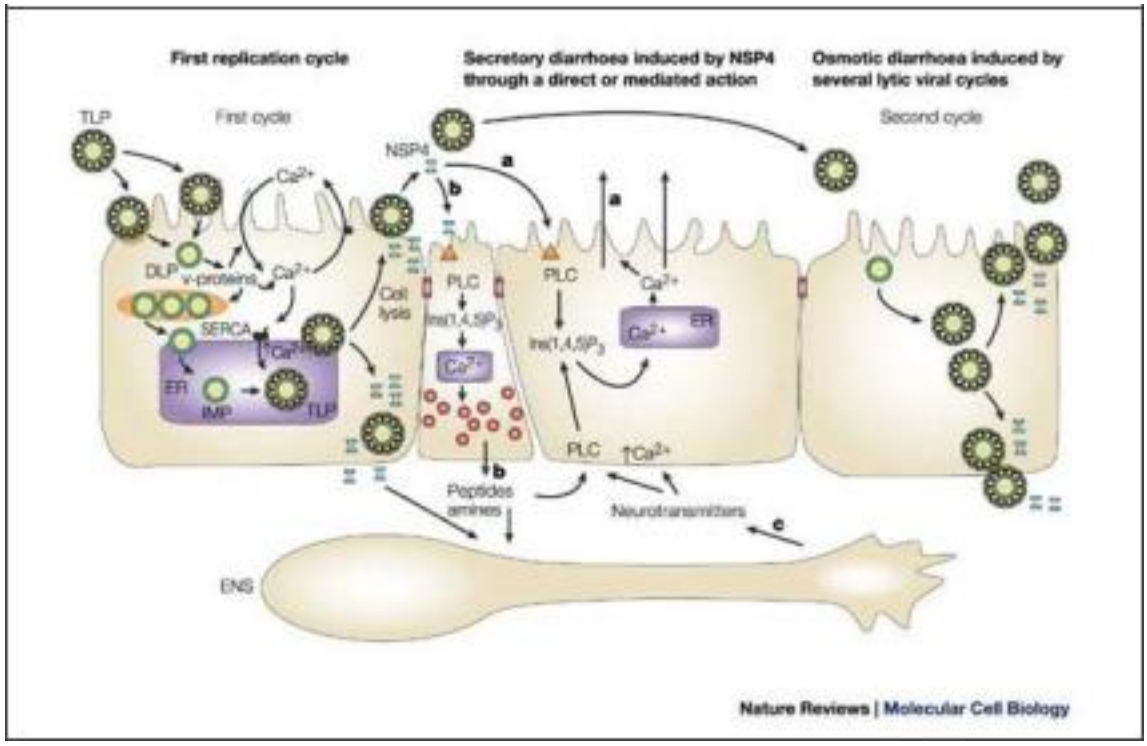
İnsan rotavirus infeksiyonu, asemptomatik, hafif seyirli veya şiddetli olmak üzere farklı şekillerde görülebilen, şiddetli seyrettiğinde ölümcül bir dehidrasyon olgusuna yol açabilen belirtiler gösterebilmektedir. İnkübasyon süresi 48 saatten daha azdır, ani kusma başlangıcı, yüksek dehidrasyon ve 5-6 gün süren ortalama ishal süresi gözlenir (Uhnoo ve ark, 1986). Rotavirus infeksiyonu ile ilgili diğer klinik olaylar arasında ateş (vakaların %30'unda) ve abdominal stres bulunur. Şiddetli dehidrasyon ve elektrolit değişiklikleri rotavirus infeksiyonunun en ciddi sonuçlarıdır ve küçük çocuklarda daha sık görülür. Bunlar, genellikle tıbbi tedaviye erişimin zayıf olduğu durumlarda semptomların başlamasından 1 ila 3 gün sonra meydana gelen ölümcül vakaların çoğundan sorumludurlar (Greenberg ve Estes, 2013).

Rotavirus infeksiyonu, ince bağırsak epitelinin işlevini değiştirerek ishale neden olur. İshalin genellikle enterosit yıkımına bağlı olarak malabsorptif etki oluşmasıyla

meydana geldiği düşünülmüştür (Kapikian ve ark., 2001). Enterosit yıkımına ek olarak, Na^{+}, su ve mukozal disakkaritlerin emilimi azalır (Chrystie ve ark., 1978; Graham ve ark., 1984). Malabsorpsiyon, sindirilmemiş mono ve disakkaritlerin, karbonhidratların, yağların ve proteinlerin kolon içine geçişiyle sonuçlanır. Sindirilmemiş içerik ozmotik olarak aktiftir, kolon yeterli suyu ememez ve ozmotik bir ishal durumu oluşur (Ramig, 2004). Bununla birlikte ishalin farklı mekanizmalarla da meydana geldiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Virus replikasyon esnasında ishale neden olan bir enterotoksin olan, yapısal olmayan proteinlerden NSP4 (Non-structural protein 4) sentezlenmektedir (Ramig, 2004). NSP4, Ca^{++} bağımlı bir sinyal yolunu aktive ederek hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu arttırır; bu, endoplazmik retikulumdan Cl^{-} iyonunu harekete geçirir. Sonuç olarak bu durum su ve elektrolit kaybına neden olur (Greenberg ve Estes, 2009) (Şekil 4). Bazı durumlarda ishalin varlığı ile bağırsak lezyonlarının paralel şekilde görülmemesi, ishali oluşturan diğer mekanizmalarının araştırılmasını teşvik etmiştir. NSP4'ün, toksin benzeri aktiviteye sahip olduğu ve farelerde denendiğinde ishale neden olduğu bildirilmiştir (Ball ve ark., 1996; Estes ve Morris, 1999; Zhang ve ark., 2000). NSP4 enterotoksin aktivitesi, bağırsak epitellerinde hasar oluşturmadan ishale sebebiyet verdiği ve yapılan bazı çalışmalarda enterik sinir sistemi (ESS)'nin etkisini bloke eden birkaç ilacın bağırsakta rotavirus kaynaklı ishali azalttığı ve rotavirus kaynaklı ishalde ESS'nin etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir (Lundgren ve ark., 2000; Lundgren ve Svensson, 2001; 2003). Farelerle yapılan deneylerde rotavirus kaynaklı oluşan ishalin sıvı ve elektrolit sekresyonunun %67'sinin ESS aktivasyonundan kaynaklandığı tahmin edilmiştir (Lundgren ve ark., 2000).

Rotavirus infeksiyonu sırasında bulantı ve kusmanın varlığı anormal mide fonksiyonunun olduğunu gösterir. Yapılan bir çalışmada rotavirus infeksiyonuna, sıvının gecikmeli boşalmasıyla (mide içeriğinin duodenuma geçişinin uzun sürmesi) ortaya çıkan anormal gastrik motor fonksiyonunun eşlik ettiği belirtilmiştir (Bardhan ve ark., 1992). Sıvıların gastrik kısımdan gecikmeli olarak boşaltılmasının sebebinin mide ile duodenum arasındaki basınç farkı olduğu belirtilmektedir. Gastrik boşalmada gecikme mekanizmalarının sinirsel sebepler ve sekretin, gastrin, glukagon (Cooke ve ark., 1975) ve kolesistokinin (Debas ve ark., 1975) gibi gastrointestinal hormonları içeren sebeplerden dolayı meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bunun yanında kusmanın oluşması, NSP4 proteininin serotonin salgısını arttırararak vagus sinirini uyardığı ve bu

yolla beynin kusma merkezinin uyarılarak rotavirus infeksiyonlarında kusma semptomunun oluştuğu da belirtilmiştir (Hagbom ve ark., 2011).



şekil 4: Rotavirus patogenezinin Şematik görüntüsü

Mukozal epitel hücrelerinde rotavirus replikasyonunun ilk döngüsü sırasında, hücre sitoplazmasındaki rotaviral proteinlerin sentezi, düzenleyici mekanizmaların aktivasyonu ve endoplazmik retikulumda (ER) Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artışına sebep olacak şekilde Ca^{2+} _nin plazma membran geçirgenliğinde artışa neden olur. İnfekte hücrelerdeki artan sitosolik Ca^{2+} konsantrasyonu, Ca^{2+} bağımlı enzimlerin aktivasyonunu teşvik eder, bu da hücre lizisini ve viral proteinlerin ve virusun salınmasını indükler. Yapısal olmayan protein 4 (NSP4) salgılanması, ishali indüklemek için henüz infekte olmamış hücreler üzerinde viral enterotoksin görevi görerek ishalin oluşmasına a) intestinal hücreler tarafından Ca^{2+}'a bağımlı sekresyon artışı b) Ca^{2+}'a bağımlı olarak peptid ve amino asitlerin sekresyonunu oluşturmak suretiyle Enterik Sinir Sistemi'ni(ESS) uyararak c) ESS etkisiyle epitel hücrelerden daha fazla Cl^- salgılanması yollarıyla etki eder. Paralel olarak infekte olan hücrelerden salınan viruslar diğer absorptif hücreleri infekte eder. Bu, büyük bir hücre ölümüne ve sonuç olarak, bağırsak epitelinin emici yüzeyinin azalmasına ve ishalin osmotik yolla ortaya çıkmasına yol açacaktır. DLP: çift katmanlı parçacık; IMP: intramembran partikülü; Ins (1,4,5) P3: inositol 1,4,5-trisfosfat; PLC: fosfolipaz C; SERCA: sarkoplazmik / endoplazmik-retikulum Ca^{2+}-ATPase; TLP: üç katmanlı parçacık. (Ruiz ve ark., 2000; Bomsel ve ark., 2003)

Rotavirus infeksiyonlarında sistemik yayılımına yönelik bulgular da bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar antijenemi ve vireminin sıklıkla meydana gelebildiğini göstermiştir, ancak bu sistemik yayılımın konakçıda oluşan patolojik bulgulardan sorumlu olduğuna yönelik çok az kanıt vardır (Nakagomi, 2005; Ramani ve ark., 2010; Fenaux ve ark., 2006). Birkaç olguda vücudun bağırsak haricinde muhtemelen menenjit (Wong ve ark., 1984), ensefalopati (Keidan ve ark., 1992;

Nakagomi, 2005) ve ensefalit (Salmi ve ark., 1978; Pager ve ark., 1986) ile ilişkili olarak beyin omurilik sıvısında da rotavirus RNA'sı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada immünohistokimya, in situ hibridizasyon ve RT-PCR analizleri kullanılarak rotavirus infeksiyonu nedeniyle ölen 3 çocuğun çeşitli doku örneklerinde patolojik araştırmalar yapılmıştır (Lynch ve ark., 2003). Bu çalışmada intestinal dokular dışında bir hastanın dalak, kalp, akciğer, böbrek, testis ve mesane dokularında diğer bir hastanın dalak, adrenal bez, pankreas ve böbrek dokularında rotavirus genomunun varlığı RT-PCR analizleri ile saptanmıştır. Bunun yanısıra üçüncü hastanın sadece merkezi sinir sistemi incelenmiş ve rotavirus genomunun varlığı tespit edilmemiştir. Bu çalışmada histolojik bulgulara göre hiçbir hastanın kesin ölüm nedeni belirlenememiştir. Sonuç olarak, çeşitli çalışmalar rotavirus infeksiyonu sırasında ölen çocukların hastalığın bazı ekstra-mukozal bulgularına sahip olabileceğini göstermektedir, ancak bunların ölüme sebebiyet vermesindeki rolü belirlenememiştir (Pager ve ark., 2000; Grech ve ark., 2001).

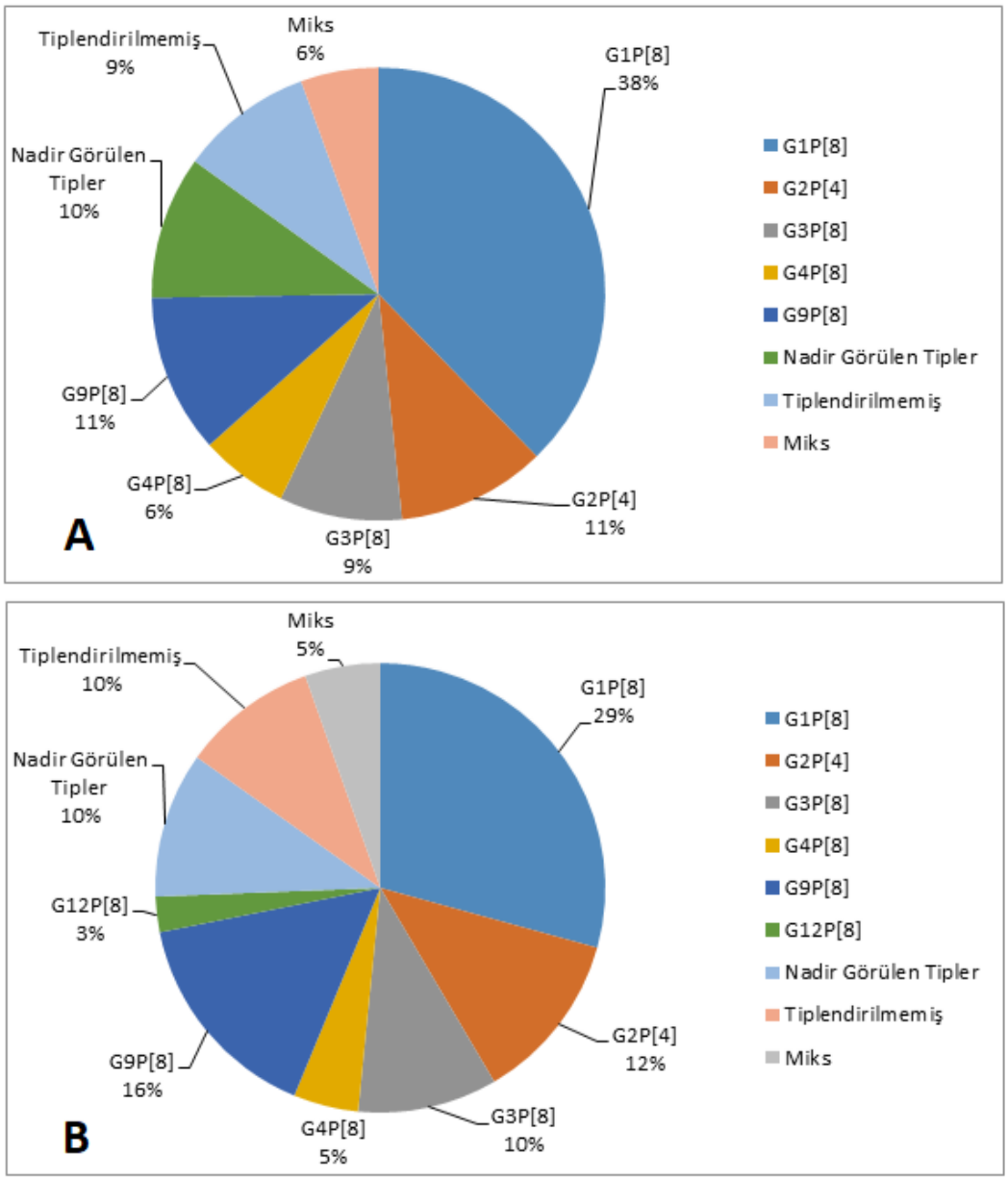
2.5. Moleküler Epidemiyolojisi

2.5.1. Dünyada Tespit Edilen Rotavirusların Moleküler Epidemiyolojisi

Rotavirusun RNA'sının segmentli yapıda olması sebebiyle reassortment yoluyla mutasyon oluşumuna çok yatkındır ve rotavirusun genotip çeşitliliği son yıllarda ortaya konmuştur. Yeni oluşan bazı suşlar doğada yok olurken bazıları bölgesel infeksiyonlar oluşturmakta, hızlıca insan populasyonunda yayılabilmekte ve global bir seyir oluşturabilmektedir. Yapılan bir çalışmada 1989-2004 yılları arasında rotavirusun VP4 ve VP7 proteinlerini içeren genotiplendirme çalışmalarında bildirilen 45.571 rotavirusun genotipleri değerlendirildiğinde G1[P8], G2[P4], G3[P8] ve G4[P8]'in en yaygın genotipler olduğu ve toplam vakaların %88'ini bu 4 rotavirus genotipinin oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada son yıllarda G9[P8] genotipinin görülme oranının arttığı bildirilmiştir (Santos ve ark., 2005). 90'lı yıllarda G9[P8] genotipinin görülme oranının artış gösterdiğini destekleyen başka bir çalışmada 1996-2007 arasında görülen rotavirus vakalarında etkenin genotipleri değerlendirilmiş ve en çok görülen 4 rotavirus genotipinin içine beşinci olarak G9[P8] genotipi de eklenmiştir. Bu araştırmada değerlendirilen 74.497 rotavirusun %74.7'sini G1[P8], G2[P4], G3[P8], G4[P8] ve G9[P8] genotiplerinin oluşturduğu bildirilmiştir (Banyai ve ark., 2012). Rotavirus genotiplerinin kıtalar arası dağılımı incelendiğinde nadir görülen genotiplerin

Afrika kıtasında diğer bölgelere oranla daha yaygın olduğu görülmektedir (Tablo 5). Ayrıca Afrika kıtasında diğer kıtaların aksine miks genotip görülme oranının daha yüksek (%11,68) olduğu bildirilmiştir (Doro ve ark., 2014).

2004-2006 yılları arasında Orta ve Güneydoğu Avrupa ülkelerinden Çekya, Slovenya, Hırvatistan, Arnavutluk ve Bulgaristan'ı kapsayan bir çalışmada rotavirus yönünden pozitif olduğu bilinen 1.500 örnek genotiplendirilmiş ve rotavirus genotiplerinin coğrafi dağılımında önemli farklılıklar saptanmıştır. Birbirine coğrafi olarak yakın bu ülkelerin bazılarında nadir görülen genotiplerin diğer ülkelerde yüksek oranlarda seyrettiği belirtilmiştir. Bu çalışmada G1[P8], G2[P4], G3[P8] ve G4[P8] tiplerinin yaygınlığı ülkelere göre %50 ile %85 arasında olduğu saptanmıştır. Dünya genelinde insanlarda en çok görülen tip olan G1[P8] Slovenya, Hırvatistan ve Çekya'da genel orana paralel olarak yüksek miktarlarda görülürken (%21.8-%46.3), Arnavutluk'ta %8.9 ve Bulgaristan'da %7.1 gibi düşük oranda olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte G2[P4] tipinin Slovenya'da görülme oranı %1.1 iken bu oran Hırvatistan'da %19.2; G9[P8] tipinin Hırvatistan'da görülme oranı %1.3 iken Bulgaristan'da bu oranın %34.3 olduğu bu çalışmada belirtilmektedir. Yine bu çalışmada nadir görülen tiplerin en yoğun görüldüğü ülke G1[P4], G2[P8], G4[P4] tiplerinin %23,4'ünü oluşturduğu Arnavutluk olmuştur (Tcheremenskaia ve ark., 2007).



Şekil 5: Yıllara göre dünya genelinde tespit edilen rotavirus genotiplerinin dağılımı

A, 1996-2007 arasındaki verilere göre tespit edilen genotiplerin dağılımı (Banyai ve ark., 2012).

B, 2007-2012 arasındaki verilere göre tespit edilen genotiplerin dağılımı (Doro ve ark. 2014)

Şekil 5'te görüldüğü gibi 90'lı yıllarda G9[P8] genotipinin görülme oranının yükseldiği gözlemlenirken aynı şekilde 2000'li yılların başında G12[P8] genotipinin de görülme oranlarının arttığı belirlenmiştir (Doro ve ark. 2014). 2007-2012 yıllarını kapsayan bir araştırmada G12[P8] genotipinin de en çok görülen tipler arasına girdiği tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada 46.967 rotavirus örneğinin %73'ünü G1[P8],

G2[P4], G3[P8], G4[P8], G9[P8] ve G12[P8] olmak üzere 6 genotip oluşturmaktadır (Doro ve ark., 2014). Böylelikle G9 ve G12 genotipleri dünyada en çok bildirilen genotipler arasına dahil olmuştur (Matthijnssens ve ark., 2010).

Tablo 5: 2007-2012 yılları arası verilere göre genotiplerin kıtalara yayılımında vaka sayıları ve oranları (Doro ve ark., 2014)

Bölge	Toplam	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G4P[8]	G9P[8]	G12P[8]	Diğer	NT*	Miks
Afrika	8224	1806 (%22)	625 (%7,6)	160 (%1,9)	84 (%1)	595 (%7,2)	630 (%7,6)	2323 (%28,2)	1040 (%12,6)	961 (%11,6
Amerika	6756	1183 (%17,5)	1694 (%25,0)	873 (%12,9	107 (%1,5)	967 (%14,3	300 (%4,4)	686 (%10,1)	639 (%9,4)	307 (%4,5)
Batı Pasifik Bölgesi	9480	3101 (%32,7	965 (%10,1)	2844 (%30)	64 (%0,6)	656 (%6,9)	7 (%0,07)	638 (%6,7)	907 (%9,5)	298 (%3,1)
Güney Doğu Asya	5728	1402 (%24,4)	787 (%13,7)	431 (%7,5)	0	480 (%8,2)	150 (%2,6)	911 (%15,9)	1180 (%20,6)	387 (%6,7)
Doğu Akdeniz Bölgesi	2341	890 (%38)	284 (%12,1)	73 (%3,1)	50 (%2,1)	263 (%11,2)	4 (%0,1)	276 (%11,8)	336 (%14,3)	165 (%7,0)
Avrupa	14438	6252 (%43,3)	1770 (%12,2)	630 (%4,3)	2027 (%14)	1827 (%12,6)	185 (%1,2)	403 (%2,8)	760 (%5,2)	584 (%4)
Toplam	46.967	14.634 (%31,1)	6.125 (%13)	5.011 (%10,6	2.332 (%4,9)	7.788 (%16,5)	1.276 (%2,7)	5.237 (%11,1)	4.862 (%10,3)	2.702 (%5,7)

*NT: Not-typed (Tiplendirilmemiş)

2.5.2. Türkiye'de Tespit Edilen Rotavirusların Moleküler Epidemiyolojisi

Ülkemizde 1987-2016 yılları arasında ishal şikayetiyle hastaneye başvuran 117.741 çocuk vakasının arasında 26.566'sının (%22,56) rotavirus yönünden pozitif olduğu ve bu vakaların %31,8'inin 5 yaşın altındaki çocuklarda görüldüğü bildirilmiştir (Tapısız ve ark. 2019). İshal bulgulu çocuklardan toplanan dışkı örneklerinin rotavirus varlığı yönünden araştırıldığı birçok çalışma yapılmışır. Çataloluk ve ark. (2005) 2000-2002 yıllarında 9 şehirde toplanan 508 örneğin 119'unda; Bozdayı ve ark. (2008) 2004-2005 yıllarında Ankara'da yapılan çalışmalarda 322 örneğin 128'inde; Ceyhan ve ark. (2009) 2005-2006 yıllarında Ankara, İstanbul, İzmir ve Adana'da toplanan 338 örneğin 179'unda; Tapısız ve ark. (2011) 2008-2009 yıllarında Ankara'dan toplanan 494 örneğin 137'sinde; Altındiş ve ark. (2016) 2009 yılında Afyon'da 150 şüpheli örneğin 15'inde; Meral ve ark. (2011) 2009-2010 yıllarında Ankara'da yapılan çalışmalarda 251 örneğin 53'ünde; Altındiş ve ark. (2012) yaptığı çalışmada 2010 yılında Anadolu'nun çeşitli bölgelerinden toplanan 495 örneğin 238'i; Koçak ve ark. (2019) 2012 yılında

yaptıkları çalışmada Ankara'da toplanan 181 örneğin 28'i, Coşkun ve Kasap (2019) 2017-2018 yılında Tokat'ta 1608 ishal bulgulu çocuk vakasından 140 tanesinin A grubu rotavirus yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır.

Ülkemizde görülen rotavirusların genotipleri yıllara ve bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Gündeşlioğlu ve ark. (2018) Adana'da yaptığı retrospektif çalışmada 2013 yılında 5 adet A grubu rotavirus pozitif örneğin %60'ının G1[P8], %40'ının G9[P8] olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte aynı çalışmada 2014 yılında 61 örneğin %37,7'si G9[P8], %21,3'ü G1[P8] iken 2015 yılında G1[P8] genotipinin tekrar en yaygın genotip olduğu görülmüş, 64 pozitif örneğin %28,1'i G1[P8] iken %10,9'unun G9[P8] olduğu; 2016 yılında ise 37 pozitif örneğin %48,6'sının G1[P8], %8,1'inin G9[P8] olduğu bildirilmiştir.

Tablo 6: Ülkemizde rotavirus genotiplerinin dağılımı (Tapısız ve ark. 2019)

Referans	Örnek sayısı	RV Pozitif örnek sayısı	G1[P8]	G2[P8]	G3[P8]	G4[P8	G2[P4]	G9[P4]	G9[P6]	G9[P8	Miks	NT*	Diğer
Çataloluk (2005)	508	119	17	5	1	27	2	0	0	2	6	28	31
Ceyhan (2009)	338	179	128	4	1	6	18	-	2	5	0	0	15
Bozdayı (2008)	322	128	71	2	1	4	2	2	4	13	3	7	19
Meral (2011)	251	53	2	3	7	3	0	0	0	1	0	0	37
Tapısız (2011)	494	100	7	5	6	1	0	0	0	19	26	0	36
Altındiş, (2012)	495	238	100	3	0	60	28	0	0	44	0	0	3
Durmaz (2014)	2102	2102	355	153	57	39	107	118	4	666	36	458	109
Altındiş (2016)	150	15	3	1	-	1	-	2	-	8	0	0	0
Bozdayı, (2016)	889	241	36	36	10	5	23	1	1	61	7	13	48
Toplam	5549	3175	719	212	83	146	180	123	11	819	78	506	298

*NT: Not-typed (Tiplendirilmemiş)

Dünya genelinde görüldüğü gibi ülkemizde de G9[P8] genotipinin görülme oranı yıllar içerisinde artış göstermiştir. Ülkemizde 2007 yılından önce yapılan 3 çalışmada A grubu rotavirus saptanmış toplam 317 örneğin 216'sı (%68,13) G1[P8] iken, 20'si (%6,3) G9[P8]'dir (Çataloluk ve ark., 2005 ; Bozdayı ve ark., 2008 ; Ceyhan ve ark., 2009). 2007 yılından sonra yapılan 5 çalışmada ise incelenen toplam 1803 A grubu rotavirus pozitif örneğin 467'si (%25,9) G1[P8] iken, 738'i (%40,93) G9[P8] genotipindedir. (Tapısız ve ark., 2011; Altındiş ve ark. 2016; Meral ve ark., 2011; Altındiş ve ark. 2012, Durmaz ve ark., 2014) (Tablo 6).

2.6. Rotavirusun Reassortment Mekanizması ve Türler Arası GeçiÇ

Doğal yapısı gereği segmentli yapıda genoma sahip rotavirusun, influenza gibi diğer segmentli yapıda genoma sahip viruslar gibi (Palese, 1977; Palese, 1993), reassortment mekanizmasıyla yeni formlarda genotipler oluşturabildiği bilinmektedir (Cook ve ark., 2004). Reassortment iki ayrı rotavirus suşunun aynı hücreyi infekte ettiği durumda replikasyon sürecinde genom segmentlerinin yer değiştirmesiyle oluşmaktadır (Ramig, 1997). 11 segmente sahip rotavirusun rastgele reassortantlar oluşturduğu düşünüldüğünde teorik olarak 2048 farklı genotip oluşma ihtimali vardır (Gouvea ve Brantly, 1995; Cook ve ark., 2004)

Rotaviruslar genellikle türe özgüdür, ancak deneysel olarak türler arası bulaşmanın da mümkün olduğu gösterilmiştir (El-Attar ve ark., 2001). Birçok vaka çalışması, insanların hayvan rotaviruslari tarafından infekte olduğunu göstermiştir (Doan ve ark., 2013; Zeller ve ark., 2012). İnsanlarda rotavirus olguları incelendiğinde nadir görülen G ve P tiplerinin bulunduğu genomik incelemeler ile belirlenmiştir. Bu nadir görülen tiplerin birçoğunun zoonotik olarak insan popülasyonunda ortaya çıkmış olmaları mümkün olduğu bildirilmiştir (Cook ve ark., 2004). Yaygın olmayan tiplerin düşük görülme oranları insan popülasyonunda bir hayvan rotavirusunun veya bir insan-hayvan reassortant virusunun görülmesinin büyük bir sıklıkta gerçekleşmeyeceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, milyonlarca insan her yıl hayvan rotaviruslarına maruz kalmaktadır. Bu maruziyet genellikle tarım topluluklarında ve kırsal alanlarda hayvanlarla yakın temasta olan insanlarda daha yoğun olarak görülmektedir (Cook ve ark., 2004).

Rotavirusun türler arası geçişi bazı deneysel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada bir sığır rotavirus izolatının domuzlar için yüksek patojenik etki

gösterdiği tespit edilmiştir. Bu rotavirusun sekans analizinde G3 rotavirus olduğu, NSP4 ve VP4 genlerinin domuz rotavirusuna ait NSP1 geninin sığır rotavirusuna ait olduğu tespit edilmiştir (El-Attar ve ark., 2001). Başka bir çalışmada grup A avian rotaviruslar memelilerde infeksiyon oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada güvercin rotavirusu (PO-13) ve hindi rotavirusu (Ty-3) farelere oral yolla verilmiş ve güvercin rotavirusunun 2-3 günlük farelerde infeksiyon oluşturduğu 10-13 günlük farelerde oluşturmadığı, hindi rotavirusunun hiçbir farede infeksiyon oluşturmadığı belirlenmiştir (Mori ve ark., 2001). Yapılan başka bir çalışmada G1P[8] insan rotavirusunun domuzlarda infeksiyöz olduğu tespit edilmiştir (Theil, 1990). İnsan rotavirusunun deneysel olarak köpekleri infekte ettiği de gösterilmiştir (Tzipori ve Makin, 1978). Köpeklerin ayrıca domuz (Osterhaus ve ark., 1980) ve sığır rotavirusları (Dagenais ve ark., 1981) ile infeksiyona karşı duyarlı oldukları ortaya konulmuştur. Bu konuda yapılan bir in vitro çalışmada avian rotavirus (Ty-1) ve simian rotavirus (RRV) aynı anda MA-104 hücrelerine inoküle edilmiştir. Bu çalışmada VP4 proteinin geninin simian rotavirus'dan köken aldığı diğer 10 proteinin ise avian rotavirusa ait olduğu yeni bir reassortant rotavirus olarak, hücre kültüründen izole edilmiştir (Kool ve ark., 1992).

Deneysel çalışmaların yanı sıra doğal olarak oluşan rotavirus infeksiyonlarında da türler arası geçiş ve virusun zoonotik özelliği birçok çalışmayla ortaya konulmuştur. Bu konuda İsrail'de çiftlik hayvanlarıyla temasta olan 1 yaşındaki bir çocuktan izole edilen rotavirus genetik yönden incelendiğinde G6P[1] genotipinde olan sığır rotavirusunun reasortment oluşmadan direkt olarak çocuğu infekte ettiği ortaya konulmuştur (Doan ve ark., 2013). Belçika'da yapılan bir çalışmada ise 1 aylık bir çocuktan izole edilen rotavirusun genetik analizinde G9P[6] genotipi olan rotavirusun bütün gen segmentlerinin insan rotavirusuna uzak olduğu, daha çok domuz rotavirusuna yakınlığını tespit edilmiştir. Bu çalışmada yapılan geriye dönük incelemede hastanın babasının domuz çiftliğinde çalıştığı belirlenmiş ve domuz rotavirusunun reassortment oluşmadan direkt olarak çocuğu infekte etmiş olabileceğine dair bildirim yapılmıştır (Zeller ve ark., 2012). Japonya'da kediyle temas hikayesi olan bir çocuğun dışkısından izole edilen rotavirusun RNA-RNA hibridizasyon yöntemiyle incelenmesi sonrası yakın zamanda izole edilen bir kedi rotavirusuyla yüksek benzerlik göstermesi sonucu bir kedi rotavirusunun insanlara bulaşabileceği yönünde bildirim yapılmıştır (Nakagomi ve ark., 1989).

Brezilya‘da nadir görülen G5 rotavirus genotipinin sekans analizleri ile yapılan incelemede insan ve domuz rotavirusları arasında doğal yolla oluşan bir reassortant olduğu bildirilmiştir (Alfieri ve ark., 1996). 1987-1988 sezonunda Hindistan‘da gastroenterit salgınında nadir görülen rotavirus izolasyonu yapılmıştır. (Ghosh ve Naik, 1989). Bu yapılan çalışmada sekans analizinde G9P[19] genotipi olduğu belirlenen rotavirusun 9 gen segmentinin domuz rotavirusuna ait olduğu belirlenmiştir (Varghese ve ark., 2003). Sığır rotavirusu genotiplerinden G6, G8 ve G10'a sahip olan suşlar, P[1], P[2], P[4], P[6], P[8], P[9], P[11] ve P[14] tipleri ile bağlantılı olarak tespit edilmiştir (Santos ve Hoshino, 2005). Sığır reassortant rotavirusu olan, G10P[11], Hint yarımadasında yaygın insan enterik patojeni olarak kabul edilmekte olup, bu genotip aday aşı olarak kullanılmıştır (Ward ve ark., 2008).

2.7. Rotavirusun Dayanıklılığı ve Ġnaktivasyonu

Rotaviruslar, çeşitli koşullar altında gıdalarda ve çevrede uzun süre infeksiyöz etkisini koruyabilmekte ve çok kolay bir şekilde kişiden kişiye bulaşabilmektedir (Mayr ve ark., 2009). Yapılan birçok araştırma rotavirusun insanların ellerinde, eşyalarda, gıdalarda ve hatta havada uzun süre infeksiyöz etkisini koruduğunu göstermiştir. pH 3-9 değerleri arasında stabil olduğu (Carter, 2005) ve uygun nem ortamında havada 9 gün aktif olabileceği bildirilmiştir (Sattar ve ark., 1984). Ansari ve ark. (1988) rotavirusun ellerle çevreye taşınabildiğini ortaya koymak için yaptıkları çalışmada virusun birkaç saat boyunca deride infeksiyöz etkisini koruduğunu bildirmişlerdir. Moe ve Shirley (1982) evde ortalama koşullar olan %30 bağıl nem ve 20 ˚C‘de rotavirusun bir haftaya kadar dayanabildiğini tespit etmişlerdir. Rapheal ve ark. (1985), 4˚C suda 64 gün boyunca rotavirusun titresinde herhangi bir düşüş olmadığını, bunun yanında 20 ˚C‘de onuncu günde %99 düşüş olduğunu kaydetmişlerdir. Badawy ve ark. (1985) rotavirusun buzdolabı koşullarında marul ve turp üzerinde 30 gün, havuçta ise 25 güne kadar, oda sıcaklığında ise marulda 25, turpta 4, havuçta 15 güne kadar infeksiyöz etkisini koruduğunu bildirmişlerdir. Rotavirusun cam, plastik ve paslanmaz çelik gibi cansız yüzeylerde oda sıcaklığında 10 günden fazla bir süre canlı kaldığı gösterilmiştir (Ansari ve ark., 1991) ayrıca rotavirus tuvalet kapı kolları, televizyonlar, oyuncaklar ve hastaların ellerinde tespit edilmiştir (Akhter ve ark., 1995).

Rotavirusun dayanıklılığıyla ilgili yapılan bu çalışmaların yanısıra gıdalarda rotavirusun inaktivasyonu için uygun yöntemlerin belirlenmesi amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Estes ve ark. (1979a) yaptığı çalışmada rotavirusun 50˚C _de 30 dakikada, Mahony ve ark. (2000) yaptığı çalışmada 60˚C'de 10 dakikada inaktive olduğu bildirilmiştir. Chen ve Vaughn (1990) rotavirusun klordioksit ile alkali pH ortamında inakive edildiğini, Vaughn ve ark (1986, 1987) ise klor ve ozonun hem asidik hem de nötr pH ortamında inaktive edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca O'Mahony ve ark. (2000) 50mJ'lük UV-C uygulamasının rotavirus titresinin 2,5 log düşmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Isıl işlemlere gerek duyulmadan, gıdalarda virusları inaktive etmek için kulanılabilen yüksek hidrostatik basınç işlemi rotaviruslar üzerinde denenmiş ve 2 dakika 450Mpa basınç uygulandıktan sonra, rotavirusların yapısının ciddi şekilde hasar gördüğü bildirilmiştir (Lou ve ark., 2015). Başka bir çalışmada 4°C_de 350 MPa basınçta rotavirusun titresinin 3,9 log düştüğü bildirilmiştir (Lou ve ark., 2011).

Yüzey temizliği için kullanılabilecek kimyasalların rotavirus üzerine etkisi incelenmiş ve rotavirusun titresinde, %0.05 yoğunlukta klorheksidin diglukonatın 1 dakikada 1 log, %70'lik ethanolün 10 dakikada 3 log, %0,125 sodyum hipokloritin 10 dakikada 3 log düşüş gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Abad ve ark. 1997). Havuz sularının dezenfeksiyonu için kullanılan kimyasalların biosidal testleri için rotaviruslar standart virus olarak kullanılmaktadır, buna göre rotavirusların 2 dakikada 3 log veya daha fazla titresinin düşürülmesi gerekmektedir (OECD, 2012).

2.8. Rotavirusun Tanısı

Hücre kültüründe virus izolasyonu ilk zamanlarda virusların tanısı için genel bir yöntem olarak uygulanmıştır, fakat sonrasında fazla ekipman gerektiği, yavaş bir tanı methodu olduğu ve sensitivesinin düşük olması sebebiyle zaman içerisinde yerini daha hızlı metotlara bırakmıştır. Rotavirusun teşhisi için uzun bir süre elektron mikroskopu (EM) kullanılmıştır (Saif ve ark., 1980). Bu teknik miks infeksiyonlarda diğer patojenlerin de tespit edilebilmesini sağlamıştır. Rotavirusu kendine özgü tekerlek şeklindeki morfolojisinden dolayı bu metodun spesifitesi yüksektir. Immuno-elektron mikroskop yöntemi sensitivitesi daha yüksek bir yöntem olmuştur (Vlasova ve ark., 2020). Rotavirusun dışkıdan tespiti için hızlı tanı kitleri daha az ekipman gerektiren, kolay uygulanabilen ve hızlı yöntemler olduğu için tercih edilir olmuşlardır. İmmunokromotografik tanı kitleri ve ELISA kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Rotavirusun tiplendirilmesi için rotavirusun 11 segmentinin jeldeki migrasyonuna dayanan SDS-PAGE yöntemi de kullanılmıştır. Günümüzde rotavirusun tanısı için RT-PCR altın standart olarak tanımlanmaktadır (Desselberger, 2014). RT-PCR, real time RT-PCR, semi-nested RT-PCR, multiplex real time RT-PCR gibi moleküler yöntemler günümüzde rotavirusun tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.8.1. Gıdalarda Rotavirusun Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Gıda kaynaklı viruslerin çoğu in vitro ortamlarda izole edilemedikleri için, tespit yöntemleri moleküler amplifikasyon tekniklerine dayanmaktadır. Moleküler yöntemler, virusların infektif ve non-infektif olduğu konusunda ayrım yapamasalar bile önemli araçlar olmaya devam etmektedir (DSÖ, 2008). Gıda ürünleri birçok maddeyi içeren kompleks matrisler oldukları için gıdadaki viral nükleik asitleri izole etmek zorlaşabilmektedir. Bunun için ekstraksiyondan önce filtrasyon, santrifüj, adsorpsiyon, elüsyon, çözücü ekstraksiyonu, çökeltme ve / veya organik flokülasyon kombinasyonları uygulanabilir. Bu işlemleri genellikle bir nükleik asit ekstraksiyon aşaması izler. Ekstraksiyon aşamasının etkinliği, Mengovirus, Murine Norovirus (MuNoV) veya Feline Calicivirus (FCV) gibi virusların internal pozitif kontrol olarak kullanılmasıyla değerlendirilebilir (DSÖ, 2008). Kabuklu deniz ürünleri, salata ürünleri, yumuşak meyveler, şişelenmiş su ve sert yüzeyler gibi ürünlerinde norovirus ve Hepatit A virusunun tespitine yönelik uluslararası standart bir method (ISO/TS 15216-2) bulunmaktadır, fakat gıdalarda rotavirusun saptanmasına yönelik uluslararası bir standart bulunmamaktadır.

2.9. Rotavirus Ġnfeksiyonlarında Koruma ve Kontrol

Klinik kullanımdaki rotavirus aşıları, reassortment insan-hayvan rotavirusları veya attenüe insan rotavirusları ile oral yoldan uygulanan canlı aşılardır. Bu aşıların etkinliği, heterotipik çapraz bağışıklığa dayanır: bir rotavirus genotipinin neden olduğu doğal bir infeksiyondan sonra, indüklenen bağışıklık, daha sonraki rotavirus infeksiyonlarına karşı koruyucu etkisini gösterir. (Velázquez ve ark, 1996; Bishop ve ark, 1983).

Rotavirusa karşı piyasaya sürülen ilk ticari aşı, insan rotavirus G1, G2 ve G3 ile reassortment edilen rhesus maymun rotavirusunun G3P[3] genotipinden türetilmiştir. Oral canlı aşı 2, 4 ve 6 aylık dönemlerde üç doz halinde kullanılmıştır. Aşının yüksek derecede reaktojenik olduğu ve birçok uygulamada ateşli reaksiyonlara neden olduğu

belirlenmiştir (Vesikari, 2012). Rotashield® ticari isimli tetravalan rhesus rotavirus aşısı ABD‘de 1998 yılında lanse edilmiş ve rutin immunizasyon programına alınmıştır (Rosillon ve ark., 2015). İlk senede 600.000 çocuk aşılanmış, fakat 1999 yılında aşıya bağlı intestinal intususepsiyon (bağırsağın iç içe girmesi) vakalarından dolayı aşı geri çekilmiştir. Daha sonra intususepsiyon riskinin çocuğun yaşı ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve 3-9 ay arasındaki çocuklara ilk dozun verilmesinin riski arttırdığı ortaya konulmuştur (Simonsen ve ark., 2005; Lynch ve ark., 2006). Rotashield® 'ın rotavirus kaynaklı şiddetli akut gastroenterite karşı gözlemlenen etkinliği % 82-91 ve hafif seyirli akut gastroenterite karşı etkinliğinin % 57-66 olduğu bildirilmiştir (Bernstein ve ark., 1995; Joensuu ve ark., 1997; Vesikari ve ark., 2006a)

2006'ya kadar Merck firması Rotateq® (RV5) ve Glaxosmithkline firması Rotarix® (RV1) isminde rotavirus aşılarının lisanslarını almışlardır. Rotateq®, 5 komponentli insan-sığır reassortant rotavirus aşısıdır. Bu komponentler G1P7[5], G2P7[5], G3P7[5], G4P7[5] (G genotipleri insan, P genotipi sığır rotavirusu) ve G6P[8] (G genotipleri sığır, P genotipi insan rotavirusu)‘dir (Vesikari ve ark., 2006a; 2006b; Vesikari , 2012). Bu aşının uygulaması 3 dozdan oluşmaktadır. İlk doz 6-12 haftalık, 2. doz 4-10 haftalık ve 3. doz 32 haftalık olmadan önce çocuğa uygulanır. Rotarix® ise insan rotavirusu G1P[8] genotipinin attenüasyonuyla üretilmiş monovalan bir aşıdır. Aşı, iki doz olarak 6. ve 24. haftalar arasında verilir; iki dozun arasında 4 hafta olacak şekilde uygulanır. Bu aşıyla ilişkili yan etkiler seyrek olmuştur. İrratibilite ve kusma görülmüştür, ancak aşıya ilişkili ateş reaksiyonları yoktur (Vesikari ve ark. 2011). İntususepsiyon riski 1,2-2,8/100 000 çocuktur (Haber ve ark. 2015).

Günümüzde kullanımda olan iki tanesi Dünya Sağlık Örgütünden olmak üzere toplam 5 adet lisanlı aşı bulunmaktadır (Tablo 7). Dünyada rotavirus infeksiyonlarının yaygınlığı ve çocuklarda ölümlerle sonuçlanabilen ciddi infeksiyonlar oluşturması nedeniyle birçok ülkede yeni rotavirus aşıları geliştirilmiş ve faz çalışmaları yapılmaktadır (Tablo 8).

Tablo 7: Mevcut lisanslı aGılar (Banyai ve ark., 2018, Burke ve ark. 2019)

Aşı	Üretici	Suş	Lisans
RotaTeq®	Merck&Co, ABD	Pentavalan insan-sığır reassortant aşı G1P7[5], G2P7[5], G3P7[5], G4P7[5], G6P[8]	Global, DSÖ önlisanslı
Rotarix^{TM}	GlaxoSmithKline Biologicals, Belçika	İnsan monovalan (G1P[8])	Global, DSÖ önlisanslı
ROTAVAC	Bharat Pharmaceuticals, Hindistan	116E, Doğal yolla oluşmuş insan reassortant suş (G9P[11])	Global
ROTASIIL	Serum Institute of India	G1, G2, G3, G4, G9	Global
Rotavin-M1	The Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals (POLYVAC), Vietnam	KH0118-2003 attenüe edilmiş insan suşu (G1P[8])	Vietnam
LanzhouLamb Virus Vaccine	Lanzhou Institute of Biological Products (LIBP) , Çin	Monovalan Kuzu Rotavirus Suşu (G10P[12])	Çin, özel sektör

Tablo 8: Klinik deneyleri devam eden aday aGılar (Kirkwood ve ark., 2019)

Aday	Üretici	Suş	Uyg. Yolu	Mevcut durumu Durumu
RV3-BB	PT Bio Farma, Indonesia (MCRI, Australia)	Human neonatal G3P[6]	Oral	Faz 2a immunite :%76 (Yeni Zelanda) Faz2b immunite ve etkinlik devam ediyor (Endonezya)
Sığır-insan reassotantları	Serum Institute of India, Pune	Pentavalent kombinasyon (G1-4, G9)	Oral	Faz 3: Liyoflize son ürün oluşturuldu
G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G8P[5] G9P[5] ve G6P[5] ana suşları	Shantha Biotechnic, Hyderabad	Tetravalent kombinasyon (G1-4)	Oral	Faz 3: 'non-inferiority' testleri tamamlandı.
	Wuhan Institute of Biological Products, China	Hexavalent kombinasyon (G1-4, G8, G9)	Oral	Faz 1: Yetişkin güvenliği tamamlandı
	Institute Butantan, Brazil	Pentavalent kombinasyon (G1-4, G9)	Oral	Faz 1: Yetişkin güvenliği tamamlandı

DSÖ Stratejik Danışma Uzmanları Grubu, 2009 yılında Rotateq® ve Rotarix® aşılarının her ikisi için de ulusal aşılama programlarına dahil edilmesi için küresel bir öneride bulunmuştur (DSÖ, 2009). Bu öneriden önce yapılan çalışmalarda, aşıları ulusal programına alan ilk ülkeler, tıbbi ziyaretlerin, hastaneye yatışların ve rotavirusa bağlı gastroenterit ile ilgili ölümlerin sayısında önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Özellikle, sekiz ülkedeki çalışmalar (ABD, Avustralya, Belçika, Avusturya, Brezilya, Meksika, Panama ve El Salvador), aşı uygulamasından sonraki iki yıl içinde beş yaş altındaki çocukların rotavirusa bağlı hastaneye yatışlarında % 49- 80 düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Patel ve ark.,2012). Herhangi bir etken sebebiyle gastroenterit bulgusuyla hastaneye yatışların tamamında %17'lik bir düşüş gerçekleşmiştir. Rotavirus aşısının gastroenterite bağlı ölümlerin Meksika'da %35 ve Brezilya'da %22 oranında azalttığı ortaya konulmuştur (Patel ve ark., 2012). Gelişmiş ülkelerde şiddetli gastroenterite karşı Rotateq ve Rotarix aşılarının etkinlik oranları %85-98 arasında olduğu bildirilirken gelişmekte olan ülkelerden elde edilen veriler bu ülkede aşıların etkinlik oranının çok daha düşük olduğunu göstermiştir (Ruiz-Palacios ve ark., 2006; Vesikari ve ark., 2006). Malawi ve Güney Afrika'da yapılan Rotarix aşı çalışmaları, yaşamın ilk yılında, şiddetli rotavirus gastroenteritine karşı %61.2'lik bir aşı etkinliğini göstermiştir (Madhi ve ark., 2016). Buna benzer olarak Rotateq aşı çalışması Gana, Kenya ve Mali'de %39.3(Armah ve ark., 2010); Bangladeş ve Vietnam'da %48,3'lük bir aşı etkinliğini göstermiştir (Zaman ve ark., 2010). Her ne kadar gelişmekte olan ülkelerde aşı etkinliği gelişmiş ülkelere kıyasla daha düşük olsa da, gelişmekte olan ülkelerde rotavirus kaynaklı akut gastroenterit sebebiyle oluşan ölümlerin sayısı çok daha fazla olduğu için düşük aşı etkinliğine rağmen önemli ölçüde çocuk ölümünün önüne geçilebilmiştir (Lopman ve ark., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Gıda Örnekleri

Bu çalışmada, İstanbul ilinde bulunan toplu tüketim ve gıda satış yerlerinden toplanan çiğ ve tüketime hazır gıda örnekleri çalışma materyallerini oluşturdu. Araştırmamızı planladığımız dönemde daha önce ülkemizde tüketime sunulan gıda örneklerinde rotavirusa yönelik bir çalışmaya rastlanılmadığı için, örnek sayısı % 95 güven aralığında, % 50 tahmini prevelansta ve % 10 hata payı düşünülerek en az 96 örnek olarak belirlendi (Erganiş, 1993). Bizim çalışmamızda 105 adet gıda örneği çalışma materyalini oluşturdu. Çalışılan gıda örneklerinin ürün grupları ve miktarları Tablo 9'da sunulmuştur. Gıda satış yerlerinden toplanan ürünler orjinal paketleri içerisinde, toplu tüketim yerlerinden toplanan ürünler ise steril poşetler içine alınarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarına getirildi ve moleküler analizler bu laboratuvarlarda yürütüldü. Her bir gıda örneği en az 100 gr olmak üzere steril poşetler içerisinde stomacher cihazında, içerisine pH 7.0 olan steril PBS eklenerek homojenizasyonu yapıldı. Ürünler homojenize edildikten sonra biri moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20 ºC'de, diğeri de virus izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80ºC'de, 2 ayrı tüp içerisinde saklandı.

Tablo 9: ÇalıÇılan gıda örneklerinin ürün grupları ve adedi.

Ürün Grubu	Ürün	Paket*
Kırmızı Et Ürünü	Hazırlanmış Kıyma	5
Kırmızı Et Ürünü	Paket Kıyma	5
Kırmızı Et Ürünü	Paket Hazır Köfte	5
Kırmızı Et Ürünü	Sucuk	5
Kırmızı Et Ürünü	Salam	5
Kırmızı Et Ürünü	Sosis	5
Kırmızı Et Ürünü	Hazırlanmış Et Ürünleri (Köfte, Kebap vs.)	5

Deniz Ürünleri	İşlenmemiş Balık	5
Deniz Ürünleri	İşlenmemiş Midye	10**
Deniz Ürünleri	Donmuş Balık	5
Deniz Ürünleri	Hazır Midye	5
Deniz Ürünleri	Kalamar	5
Kanatlı Ürünleri	Soslu Tavuk Kanat	5
Kanatlı Ürünleri	Göğüs Eti	5
Kanatlı Ürünleri	Tavuk Kanat	5
Kanatlı Ürünleri	Tavuk Snitzel	5
Kanatlı Ürünleri	Tavuk Jambon	5
Kanatlı Ürünleri	Tavuk Sosis	5
Kanatlı Ürünleri	Tavuk Salam	5
Kanatlı Ürünleri	Hindi Sosis ve Hindi Salam	5
Toplam		105

*Her bir paket en az 100gr gıda örneği içermektedir.

** Her pakette 15 adet midye bulunmaktadır.

3.1.2. Moleküler TeĢhis Materyalleri

3.1.2.1. Viral RNA Ekstraksiyon Kiti

RNA ekstraksiyonu için ticari kit (Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Katalog no:11858874001) önerilen çalışma protokolüne uygun olarak kullanıldı.. Ticari kitin içeriği Elution Buffer, Binding Buffer, Wash Buffer, Removal Buffer, Poly A, filtreler ve tüplerden oluşmaktadır.

3.1.2.2. cDNA Sentezi

Viral RNA‘dan cDNA elde etmek için Promega marka Reverse Transcription System (Katalog No: A3500) kullanıldı. Ticari kitin içeriğini Random Primer, 10mM

each dNTP Mix, Oligo dT Primer, $MgCl_2$ (25mM), 10X Buffer, AMV Reverse Transcriptase, Nuclease Free Water ve RNase Inhibatör Rnasin oluşturmaktadır.

3.1.2.3. Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Gıdalarda rotavirusun tespiti için A grubu rotavirusun VP4 ve VP7 proteinlerinin spesifik gen bölgeleri hedef alındı. RT-PCR yöntemi kullanılarak, VP4 viral proteini için 877 bp uzunluğundaki gen bölgesine spesifik con3 & con2 primerleri kullanıldı (Gentsch ve ark., 1992). VP7 viral proteini içinse 1062 bp uzunluğundaki gen bölgesine spesifik sBeg9 & End-9 primerleri kullanıldı (Gouvea ve ark., 1994; Hasöksüz ve ark.,2008). Kullanılan primerlerin dizilimi Tablo 10'de sunulmuştur.

RT-PCR ile teşhis için Promega marka GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Katalog no: M7805) isimli ticari kit kullanıldı. Ticari kitin içeriğini 10mM dNTP, $MgCl_2$, 5X Green Go Taq Flexi Buffer, Go Taq Flexi DNA Polimerase oluşturmaktadır.

Elde edilen RT-PCR ürünlerini yürütmek amacıyla 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) solüsyonu, Sigma marka agaroz (Katalog No: A9539-100G), Applichem ethidium bromide (Katalog No: A1152,0025) ve 100bp'lik DNA marker (Solis Biodyne 100bp DNA Ladder kat. no: BPB0190) kullanıldı.

Tablo 10: A grubu Rotavirus tespiti için kullanılan primer dizilimleri.

Gen Bölgesi	Primer Adı	Primer dizilimi (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)
VP4	Con3	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	877
	Con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	
VP7	sBeg9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC	1062
	End-9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	

3.1.2.4. Purifikasyon Kiti

Pozitif bulunan numunelerin sekans işlemi öncesinde PCR ürünlerinin purifikasyonu amacıyla Roche marka High Pure PCR Product Purification Kit (Katalog No: 11732668001) isimli ticari kit kullanıldı.

3.1.2.5. Pozitif Kontrol

RT-PCR testinde rotavirusun saptanması çalışmalarında rotavirus pozitif kontrol olarak kullanılan sığır rotavirus B 223 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünden temin edilmiştir (Gülyaz ve ark, 2005).

3.1.2.6. Moleküler Testlerde Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar

Gıda örneklerin homojenizasyonu için Seward Stomacher® 400 Circulator kullanıldı. RT-PCR çalışmaları için ise BioRad T100 Thermal Cycler termosiklus cihazı kullanıldı. Jel elektroforez yönteminde jelde RT-PCR ürünlerini yürütmek amacıyla Thermo EC250-90 yatay jel elektroforez cihazı, jeli görüntülemek için Vilber Lourmat Infinity1000/20M görüntüleme sistemi kullanıldı.

3.1.3. Virus İzolasyonu için Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

3.1.3.1. Hücre Kültürü

RT-PCR test sonucunda rotavirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinin -80ºC derecede saklanan numunelerinden hücre kültürlerinde virus izolasyonu çalışmaları için MA-104 hücre kültürü kullanıldı. Bu amaçla hücre kültürü Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünden temin edildi.

3.1.3.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Rotavirus İzolatı

RT-PCR testinde rotavirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinin hücre kültürüne virus izolasyonu çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan sığır rotavirus B 223 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünde temin edilmiştir (Gülyaz ve ark, 2005).

3.1.3.3. Hücre Üretme Vasatı

MA-104 hücrelerinin çoğaltılması için Lonza marka ticari EMEM (Katalog No: BE-125F) vasatı kullanıldı.

Hücrelerin çoğaltılması için %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 konsantre antibiyotik (3.1.3.7'de içerdiği antibiyotikler ve oranları verilmiştir) solüsyonu içeren EMEM kullanıldı

3.1.3.4. Phosphate Buffer Saline (PBS)

Sigma Aldrich marka ticari PBS (Katalog No: P4417) kullanıldı.

3.1.3.5. Tripsin-EDTA solusyonu

Flasklarda çoğaltılan adherent hücrelerin yüzeyden kaldırılması için Sigma-Aldrich marka ticari Tripsin-EDTA solusyonu 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 Solusyonu

Antibiyotik solusyonu için Applichem marka ticari Penisilin G (Katalog No:1837,0025) ve Streptomisin Sulfate (Katalog No : A1852,0025) kullanıldı. Her bir mililitrede 100 İ.Ü Penisilin G, 100 µg Streptomisin Sülfat ve 9 mg NaCl olacak şekilde; 7,95 gr Penisilin G, 12,5 gr Streptomisin Sülfat ve 2,25 gr NaCl 250ml distile su içerisinde hazırlanarak 0,2 µm'lik filtrelerden geçirildi ve -20°C'de 5ml'lik tüpler içerisinde saklandı.

3.1.3.8. L-glutamine

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

3.1.3.9. Virus Ġzolasyon Vasatı

%1 antibiyotik solusyonu içeren EMEM vasatı kullanıldı.

3.1.3.10. Alkaline Tripsin Versene (ATV) Solusyonu

Virus izolasyonu için hücre kültürüne ekimden önce rotavirusun proteaza duyarlı VP4 proteinin hücre duvarına tutunmasında etkili VP5 ve VP8 proteinlerine

ayrılabilmesi için ATV solusyonu kullanıldı Bu işlem için Himedia marka ticari 1:250 tripsin (Katalog no: RM 713-500G) kullanılmıştır. 4gr NaCl (Sigma-Aldrich kat no: S3014), 0,2gr KCL (Sigma-Aldrich kat no: P9541), 0,29 gr $NaHCO_3$, 0,25gr Trypsin (1:250), 0,1gr EDTA (Sigma-Aldrich kat no: E6758-100G) , 0,5 gr Dekstroz 500 ml distile su içerisinde hazırlanarak 0,2 µm'lik filtrelerden geçirildi ve steril koşullar altında 5ml'lik tüpler içerisine alınarak -20°C'de saklandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Gıda Örneklerinin Homojenizasyonu

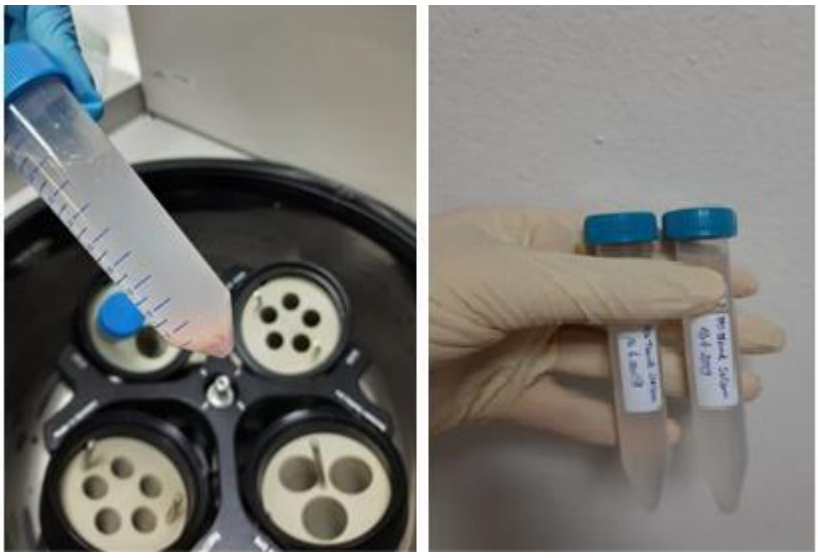
Toplanan gıda örnekleri otoklavlanmış havanlar içerisinde steril bistüri ucuyla küçük parçalar haline getirildi ve steril poşetlere aktarıldı (Şekil 7). Steril poşetlerin içerisine 150 ml PBS eklenerek stomacher cihazı içerisinde 10 dakika boyunca homojenize edildi (Şekil 7). Steril poşetin içerisindeki üst sıvı 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 4°C'de, 4000rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek gıda artıkları çökeltildi ve üst sıvıdan pipet yardımıyla 15ml'lik tüplere ikişer örnek olacak şekilde pay edildi (Şekil 8). Moleküler çalışmalarda kullanılacak birinci tüpler -20°C'de, virus izolasyon çalışmasında kullanılacak ikinci tüpler -80°C'de saklandı.



ġekil 6: Homojenize edilmek üzere ayıklanan midye örnekleri



Şekil 7: Gıda ürünlerini parçalama ve homojenizasyon işlemleri



Şekil 8: Elde edilen üst sıvının santrifüj işlemi

3.2.2. Moleküler Teşhis Çalışmaları

3.2.2.1. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu

-20°C'de bekletilen gıda örneklerinden hazırlanmış olan homojenatlar oda sıcaklığında çözündürüldü. Viral nükleik asit ekstraksiyon kitinde belirtilen protokole uygun olarak, aşağıdaki belirtilen şekilde uygulama yapıldı:

1- 4µl poly A ve 200µl Binding Buffer karıştırılarak çalışma solusyonu hazırlandı.

2- 200µl örnek, 200µl çalışma solusyonu ve 50µl Proteinaz K bir tüpte karıştırıldı.

3- Karışım vortekslendi ve 72°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4-Karışıma 100µl Binding Buffer eklenerek tekrar vortekslendi ve toplama tüplerindeki kolonlara transfer edildi.

5- 8.000rpm _de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

6- 500µl Inhibitor Removal buffer eklendi.

7- 8.000rpm _de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

8- 450µl wash buffer eklendi.

9- 8.000rpm _de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

10- 500µl wash buffer eklendi.

11- 8.000rpm _de 1 dakika santrifüj edildi.

12- Alttaki sıvı döküldü ve kolon aynı tüpe takıldı.

13- 13.000 rpm'de 10saniye santrifüj edildi.

14- Kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldı.

15- 50 µl Elution Buffer eklendi. 8.000rpm _de 1 dakika santrifüj edildi.

16- Kolon atıldı. Elde edilen nükleik asit RT-PCR için kullanıldı ve -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.2.2. cDNA Sentezi

Her bir örnek için, izole edilen RNA ürününden 5µl PCR tüpüne konularak kuru blok ısıtıcıda 70°C'de 10 dakika inkübasyon sonrasında 2 dakika buzda bekletildi. Daha sonra Tablo 11'de verilen oranlarda hazırlanan mastermix karışımından 15µl alınarak

inkübasyonu biten örneklerin bulunduğu tüpe eklendi ve Tablo 12‘da belirtilen sıcaklık zaman döngüleri uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 11: cDNA sentezi için kullanılan mastermix içeriği:

1 Örnek	**Miktar (µl)**
10 X buffer	2
$MgCI_2$ (25 mM)	4
dNTPs (10 mM)	2
Random primer	1
AMV	0,7
Rnasin 40U/ µl	0,5
ddH2O	4,8
TOPLAM:	**15 µl**

Tablo 12: cDNA sentezi için sıcaklık-zaman döngüsü:

Sıcaklık (°C)	**Süre (dk)**
22	10
42	15
95	5
4	5

3.2.2.3. A Grubu Rotavirusun VP4 Proteinine Spesifik Gen Bölgesi için RT-PCR

Tablo 13'de verilen oranlarda hazırlanan mastermix karışımı ve sentezlenen cDNA bir tüp içerisinde Tablo 14'te belirtilen sıcaklık zaman döngüleri uygulanarak amplifikasyon işlemi tamamlandı.

Tablo 13: A grubu Rotavirusun VP4 gen bölgesi için RT-PCR mastermix içeriği:

	Miktar (µl)
cDNA	5
5 X buffer flexi color	5
$MgCI_2$ (25 mM)	3
dNTPs (10 mM)	1
Con3 (20 pmol)	1
Con2 (20 pmol)	1
Go Taq Flexi DNA Polimeraz	0,5
ddH2O	33,5
TOPLAM:	**50 µl**

Tablo 14: A grubu Rotavirusun VP4 gen bölgesi için RT-PCR sıcaklık-zaman döngüsü:

	Sıcaklık (°C)	**Süre (dk)**	**Döngü Sayısı**
Denatürasyon	94	3	
Denatürasyon	95	1	35
Bağlanma	55	2	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	7	

3.2.2.4. A Grubu Rotavirusun VP7 Proteinine Spesifik Gen Bölgesi Ġçin RT-PCR:

Rotavirusun VP7 proteinine spesifik gen bölgesi için örnekler moleküler olarak incelendi. Bunun için sentezlenmiş olan cDNA örnekleri Tablo 15'te verilen oranlarda hazırlanan mastermix karışımı ile bir tüpe eklendi ve Tablo 16'da belirtilen sıcaklık zaman döngüleri uygulanarak amplifikasyon yapıldı.

Tablo 15: A grubu Rotavirusun VP7 gen bölgesi için RT-PCR mastermix içeriği:

	Miktar (µl)
cDNA	5
5 X buffer flexi color	5
$MgCI_2$ (25 mM)	3
dNTPs (10 mM)	1
sBeg9 primer F(20 pmol)	1
End9 primer R(20 pmol)	1
Go Taq Flexi DNA Polimeraz	0,5
ddH2O	33,5
TOPLAM:	**50 µl**

Tablo 16: A grubu Rotavirusun VP7 gen bölgesi için RT-PCR sıcaklık-zaman döngüsü:

	Sıcaklık (°C)	**Süre (dk)**	**Döngü Sayısı**
Denatürasyon	94	3	
Denatürasyon	95	1	35
Bağlanma	55	2	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	7	

3.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforez

RT-PCR işleminden sonra elde edilen DNA'ların analizi için agar jel elektroforez yönetimi kullanıldı. %1,5'luk agaroz jel 1X TAE buffer kullanılarak hazırlandı. Üzerine 5µl ethidium bromide eklenerek tarakları takılmış elektroforez tankına döküldü ve katılaşması için oda sıcaklılığında bekletildi. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılarak 9 µl DNA jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 45 dakika boyunca 100 volt'luk elektrik akımı uygulanarak DNA ürünleri yürütüldü. Jel görüntüleme cihazında UV ışığı altında gözlemlendi ve görüntüler kaydedildi.

3.2.2.6. Elde Edilen PCR Ürünün Purifikasyonu

PCR pozitif örneklerin DNA dizilimi amacıyla (sekans) PCR ürünlerinin purifikasyonu için kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

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

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

- Kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

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

- Kolon başka bir toplama tüpüne takıldı.

- 200 µl Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldı.

- 50 µl Elution Buffer eklendi. 14.000 rpm _de 1 dakika santrifüj edildi.

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

3.2.2.7. Sekans ĠÇlemleri

Sekans işlemi Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuvarında hizmet alımı gerçekleştirilerek yapıldı. Sekans işlemi ABI 3130XL Genetic Analyzer cihazı ile Sanger methodu ile yapıldı.

Sekans sonuçları DNAStar ve MegaX10 genetik analiz programları kullanılarak değerlendirildi. NCBI Gen Bankasındaki referans genlerle karşılaştırıldı. Filogenetik haritaları çıkarıldı.

3.2.3. Virus İzolasyon ÇalıŞmaları

Hücre kültüründe virus izolasyon çalışmaları Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Aşılar Üretim Laboratuvarında yapıldı.

3.2.3.1. Hücrelerin Çözündürülmesi

Sıvı azot tankında muhafaza edilmekte olan MA-104 hücreleri 37ºC'deki su içerisinde hafifçe sallanarak çözündürüldü. Çözündürülen hücre solusyonu santrifüj tüpüne alınarak 4°C'de 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. DMSO içeren üst sıvı döküldü ve tüpün altında çökeltilen hücre, hücre kültürü vasatıyla dilüe edilerek 75 cm^2'lik flaska aktarıldı, 37^0C'deki hücre kültürü vasatıyla 25 ml'e tamamlanarak %5 CO_2'li etüvde 37^0C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.2. MA-104 Hücre Kültürünün Pasajlanması

Çözündürülmüş ve flasklarda %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmış olan MA-104 hücreleri pasajlandı. Bunun için flaskta bulunan vasat döküldü ve flaska PBS eklenerek flaskın tabanınında gezdirilerek hücreler yıkandı. PBS pipet ile flaskın içinden alınarak 2 ml Tripsin solusyonu eklendi, flask yüzeyinden hücrelerin kalkması için beklendi. Flasktan hücrelerin kalkmasının ardından flaska 5 ml hücre vasatı eklendi ve yüzey bu vasatla dilüe edildikten sonra pipet ile çekilerek santrifüj tüplerine alındı. 4^{o}C'de 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra tekrar 5 ml vasat eklendi, pipetasyon işlemi yapıldıktan sonra tekrar santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Hücreler %10 FCS içeren vasatla dilüe edildikten sonra 25 cm^2'lik 6 adet flaska alındı. Flasklarda hücrelerin monolayer oluşumu takip edildi (George ve ark., 1996).

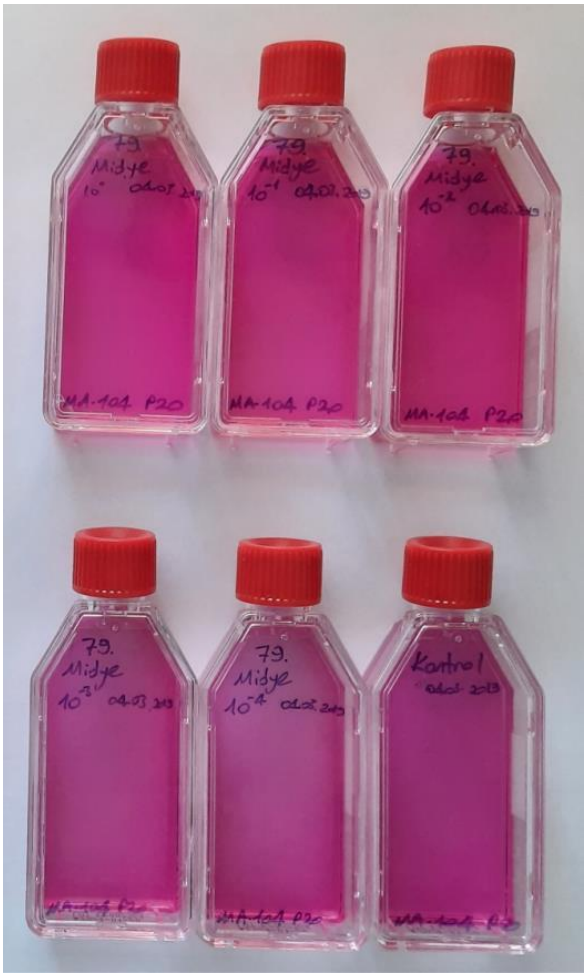
3.2.3.3. İnokulumun Hazırlanması

Daha önce homojenatları hazırlanmış ve 15ml'lik tüplerde -80^{o}C'de bekletilen örnekler oda sıcaklığında çözündürüldü. 4^{o}C'de 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve üst sıvısı 0.2 µm por çaplı membran filtrelerden geçirildi (Hierholzer ve Killington 1996, Arnold ve ark., 2009).

3.2.3.4. MA-104 Hücre Kültürüne Ġnokulasyon

RT-PCR ile rotavirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinden hazırlanan inokulum 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} olacak şekilde sulandırılarak hücre kültürlerine ekimi yapıldı. 25 cm^2'lik flasklarda hazırlanmış olan MA-104 hücrelerinin %10 FCS içeren vasatların döküldü. Flasklar 3 kere serumsuz vasatla yıkandıktan sonra 7,5 ml serumsuz vasat flasklara konularak 37°C'de %5 CO_2 ortamlı etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sırada gıda örneklerinden hazırlanan inokulumlara 10µg/ml oranında tripsin eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda inokulum vasat ile dilüe edildi ve tripsinin son konsantrasyonu 2 µg/ml'den az olacak şekilde ayarlandı. Flasklardan vasatlar döküldü ve dilüe edilen örneklerden 0,5 ml olarak hücrelere inokule edildi. İnokulasyondan sonra inokulum flaskın yüzeyine dağıtmak için hafifçe sallandı. 1 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sürecinde her 15 dakikada bir hücre flaskı nazikçe sallanarak inokulumun yüzeye yayılması sağlandı. İnkübasyon sonunda inokulum hücre içinden pipet yardımıyla çekilerek 0.5 µg/ml tripsin içeren EMEM vasattan 7,5 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. 5 gün sonunda flasklar 3 kez dondurulup çözündürüldü. 15ml'lik tüplere alınarak 4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları alınarak tekrar virus izolasyonu çalışması için kullanıldı. Örneklere bu yöntemle 5 kez kör pasaj yapıldı.



şekil 9: 79 no'lu rotavirus poztif midye örneğinden hücre kültürüne ekim flaskları

3.2.4. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi

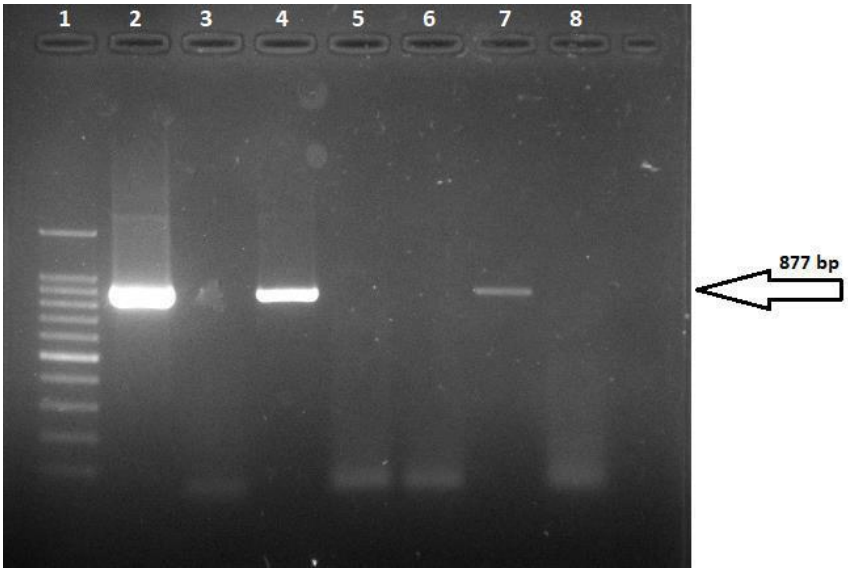
Farklı et ürünlerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar Cochran Q testi ile analiz edilmiş olup, elde edilen sonuçlar arasındaki farklılık $p<0.05$ anlamlılık düzeyine göre değerlendirildi.

Cochran Q testi farklı gruplarda yapılan işlemlerin sonuçlarının iki değer alabilen bir değişkenin oluştuğu durumlarda, etki bakımından anlamlılığın değerlendirilebilmesi için kullanılacak analiz testlerinden biri olduğu için, elde edilen sonuçların istatistiksel analizi bu teste göre yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. PCR Sonuçları

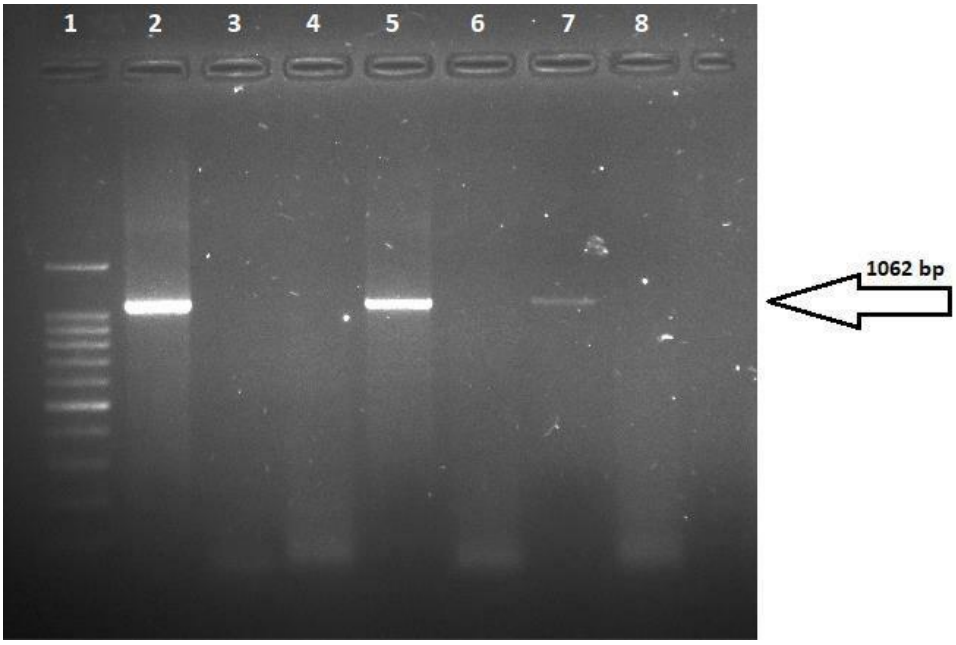
Toplanan 105 gıda örneğinin, rotavirusun VP4 gen bölgesi yönünden RT-PCR ile analizi sonucu 79 ve 87 numaralı 2 adet midye örneğinin pozitif, diğer gıda örneklerinin negatif olduğu saptandı (Şekil 10).



ġekil 10: VP4 geni ile yapılan RT- PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü

1: Marker, 2: Pozitif Kontrol, 3: Negatif Kontrol, 4: Midye (79 numaralı örnek), 5: Paket Kıyma, 6: Göğüs Eti, 7: Midye (87 numaralı örnek), 8: Kebap

Toplanan 105 gıda örneğinin, rotavirusun VP7 gen bölgesi yönünden RT-PCR ile analizi sonucu 79 ve 87 numaralı 2 adet midye örneğinin pozitif, diğer gıda örneklerinin negatif olduğu saptandı (Şekil 11).



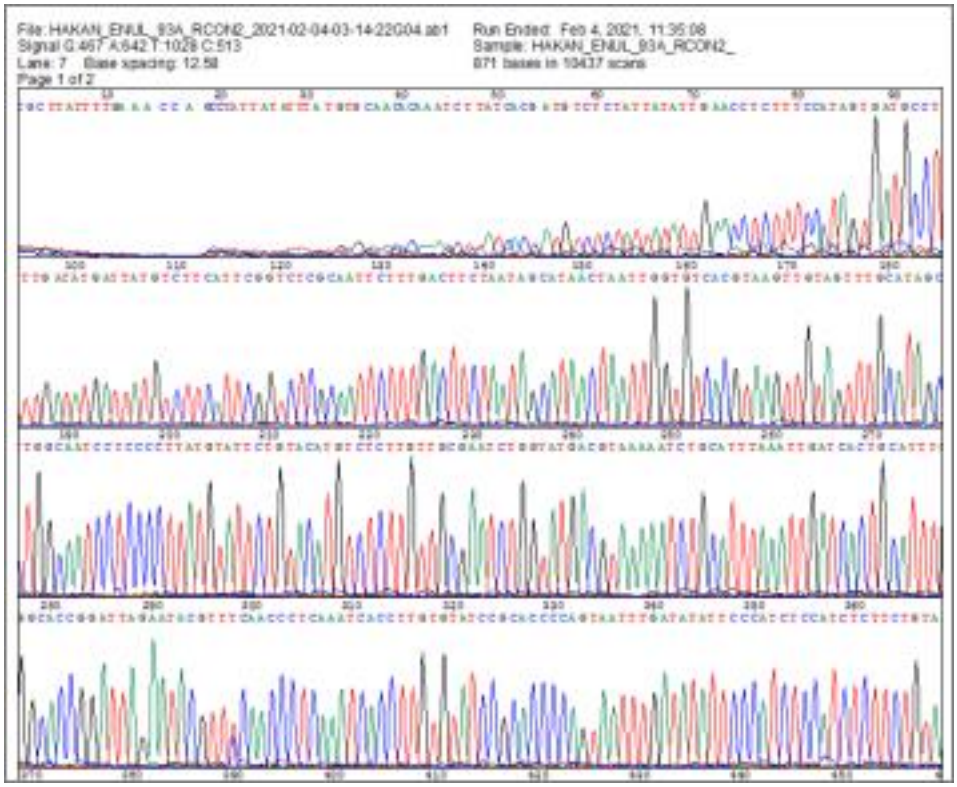
Şekil 11: VP7 geni ile yapılan RT- PCR sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü

1: Marker, 2: Pozitif Kontrol, 3: Negatif Kontrol, 4: Paket Kıyma, 5: Midye (79 numaralı örnek), 6: Göğüs Eti, 7: Midye (87 numaralı örnek), 8: Kebap

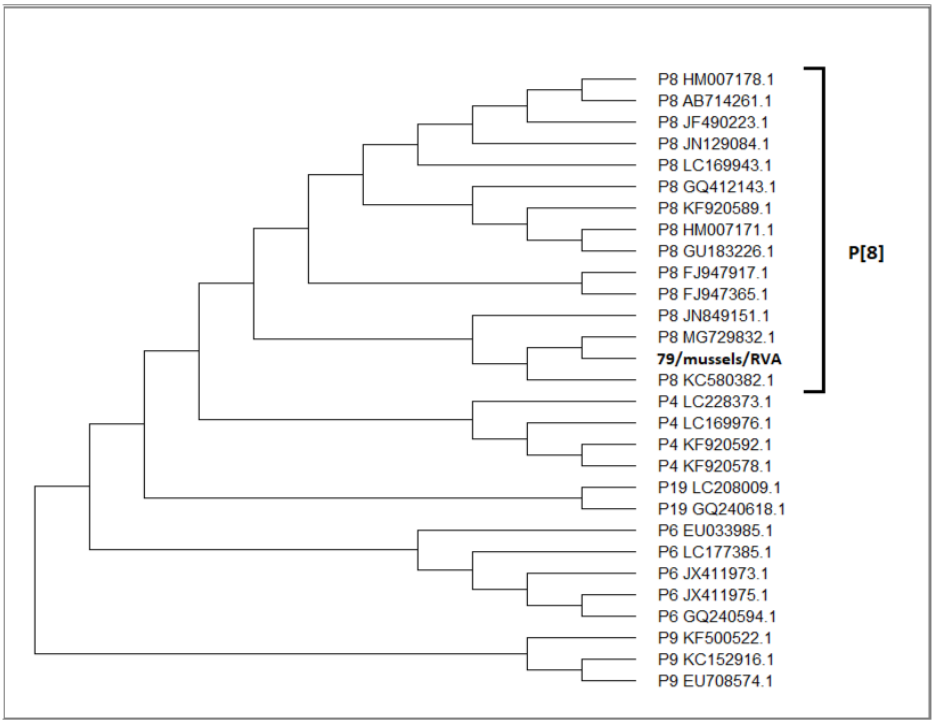
4.2. Sekans Sonuçları

4.2.1. VP4 Gen Bölgesi Sekans Analizi

Rotavirus yönünden pozitif olduğu tespit edilen 2 midye örneğinden zayıf bantlı 87 numaralı örneğin sekans sonuçlarında temiz kromotogram elde edilemediği için sekans analizi yapılamadı. 79 numaralı numunenin VP4 gen bölgesi için yapılan RT-PCR ürünlerinin sekans sonuçlarının kromotogramları Chromas software programıyla incelendi (Şekil 12). Sekansın başlangıç ve son bölümlerinde okunmayan bölümler ayıklandı. Örneğin F (Con3 primeri) ve R (Con2 primeri) primerleri ile yapılan sekansları birleştirilerek BLAST analizleri yapıldı. Bu amaçla DNAStar programında NCBI gen bankasından elde edilen rotavirus P genotiplerinin referans gen dizilimleri ile karşılaştırıldı. Daha sonra MegaX10 software programında pozitif örneğin sekansı ile referans sekansların filogenetik analizi için Neighbor-Joining metodu kullanıldı. Yapılan analiz sonucu pozitif örneğin A grubu rotavirus olduğu ve P[8] genotipik özellikte olduğu saptandı (Şekil 13).



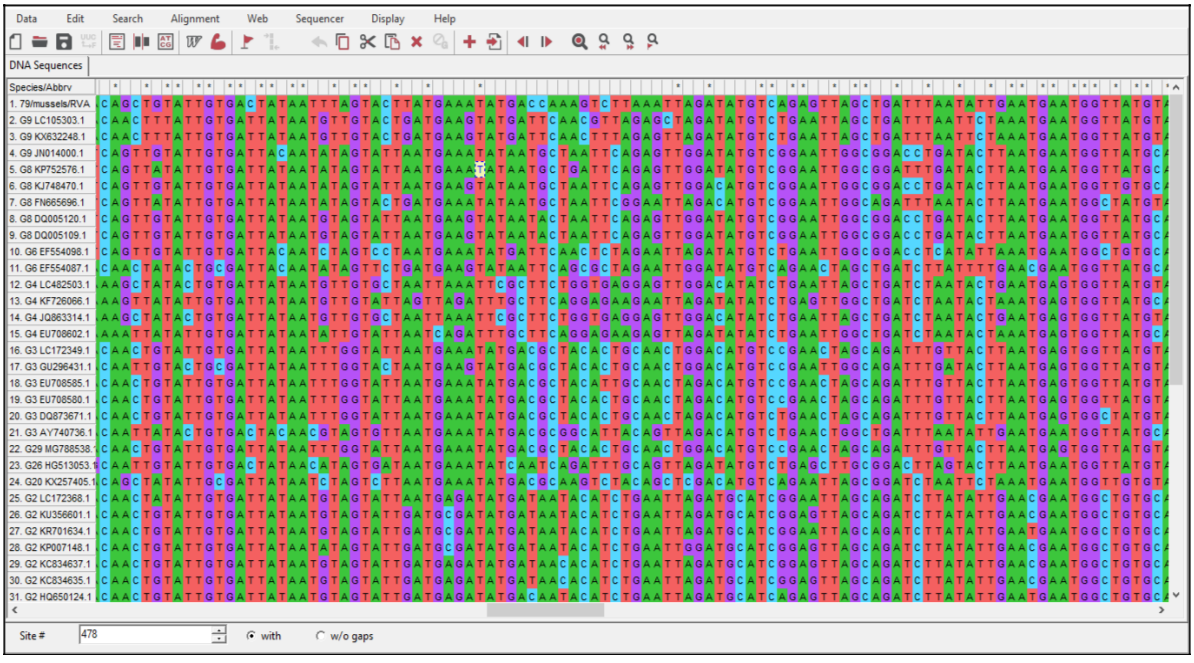
Şekil 12: Elde edilen kromotogramların Chromas programıyla görüntülenmesi



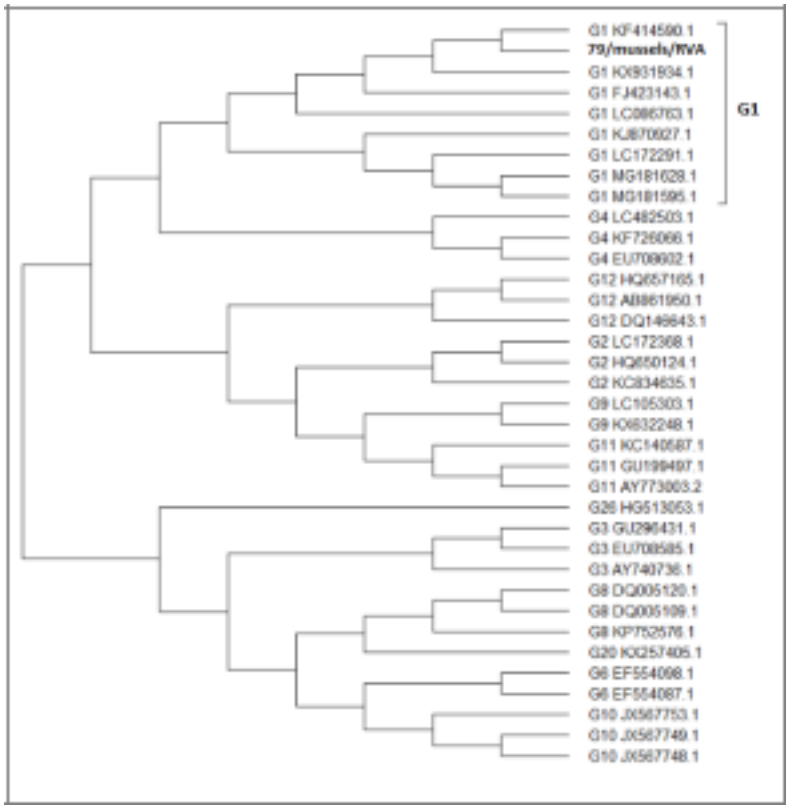
Şekil 13: 79 numaralı midye örneğinde saptanan rotavirusun VP4 gen bölgesinin Neighbor-Joining methodu ile NCBI'da rapor edilen suÇlarla oluÇturulmuÇ soyağacı

4.2.2. VP7 Gen Bölgesi Sekans Analizi

Rotavirus yönünden pozitif olduğu tespit edilen 2 midye örneğinden zayıf bantlı 87 numaralı örneğin sekans sonuçlarında temiz kromotogram elde edilemediği için sekans analizi yapılamadı. 79 numaralı numunenin VP7 gen bölgesi için yapılan RT-PCR ürünlerinin sekans sonuçlarının kromotogramları Chromas software programıyla incelendi. Sekansın başlangıç ve son bölümlerinde okunmayan bölümler ayıklandı. Örneğin F (sBeg primeri) ve R (End9 primeri) primerleri ile yapılan sekanslar birleştirilerek BLAST analizleri yapıldı. Bu amaçla DNAStar programında NCBI gen bankasından elde edilen rotavirus G genotiplerinin referans gen dizilimleri ile karşılaştırıldı (Şekil 14). Daha sonra MegaX10 software programında pozitif örneğin sekansı ile referans sekansların filogenetik analizi için Neighbor-Joining metodu kullanıldı. Yapılan analiz sonucu pozitif örneğin A grubu rotavirus olduğu ve G1 genotipik özellikte olduğu saptandı (Şekil 15).



şekil 14:Elde edilen DNA diziliminin referans G tipleri ile hizalama iÇlemi

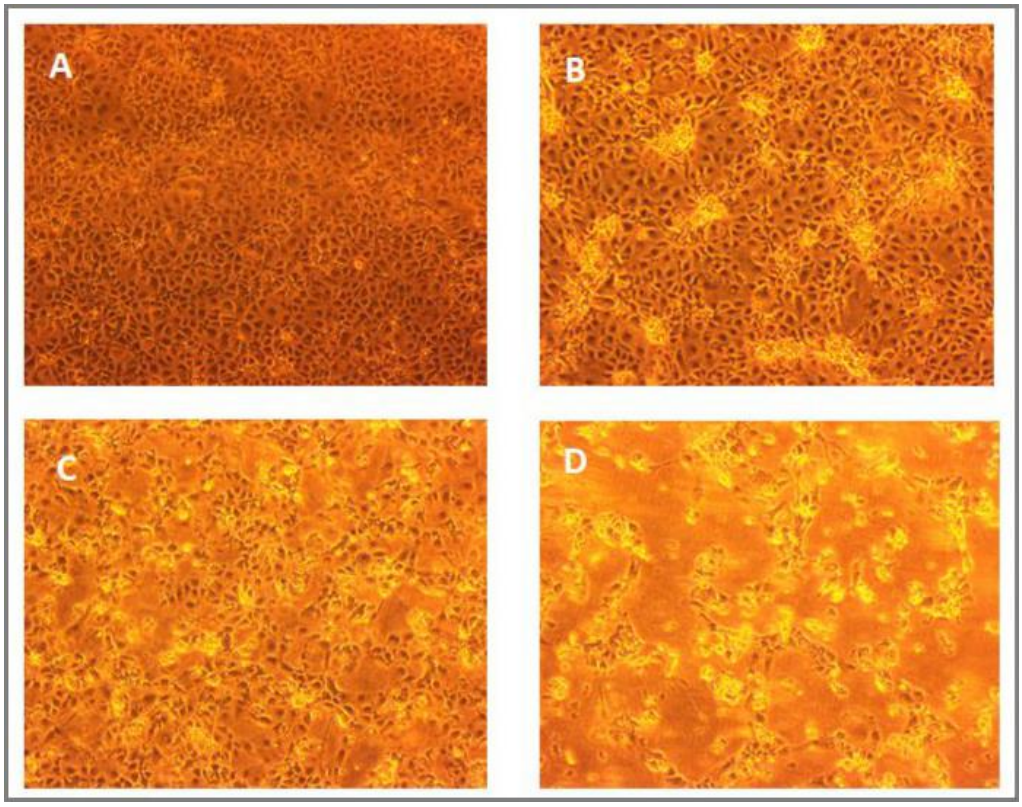


Şekil 15: 79 numaralı midye örneğinde saptanan rotavirusun VP7 gen bölgesinin Neighbor-Joining methodu ile NCBI'da rapor edilen suŞlarla oluŞturulmuŞ soyağacı

4.3. Virus İzolasyon Sonuçları

Pozitif kontrol olarak MA-104 hücrelerine ekilen sığır rotavirus B 223 suşunun 2-4. günlerde oluşturduğu CPE görüntüleri Şekil 16'da sunulmuştur.

79 ve 87 numaralı rotavirus pozitif örneklerinin inoklumlarından MA-104 hücre kültürlerine ekimleri yapıldı ve 5 kör pasaj sonucunda herhangi bir CPE görülmedi. Beşinci kör pasajı yapılan flasklar 3 kere don-çöz yapıldıktan sonra 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp 4000 rpm'de 4 ^{o}C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvısından alınarak hem VP4 hem de VP7 gen bölgeleri yönünden RT-PCR ile analiz edildi. Rotavirus yönünden herhangi bir pozitiflik tespit edilmedi.

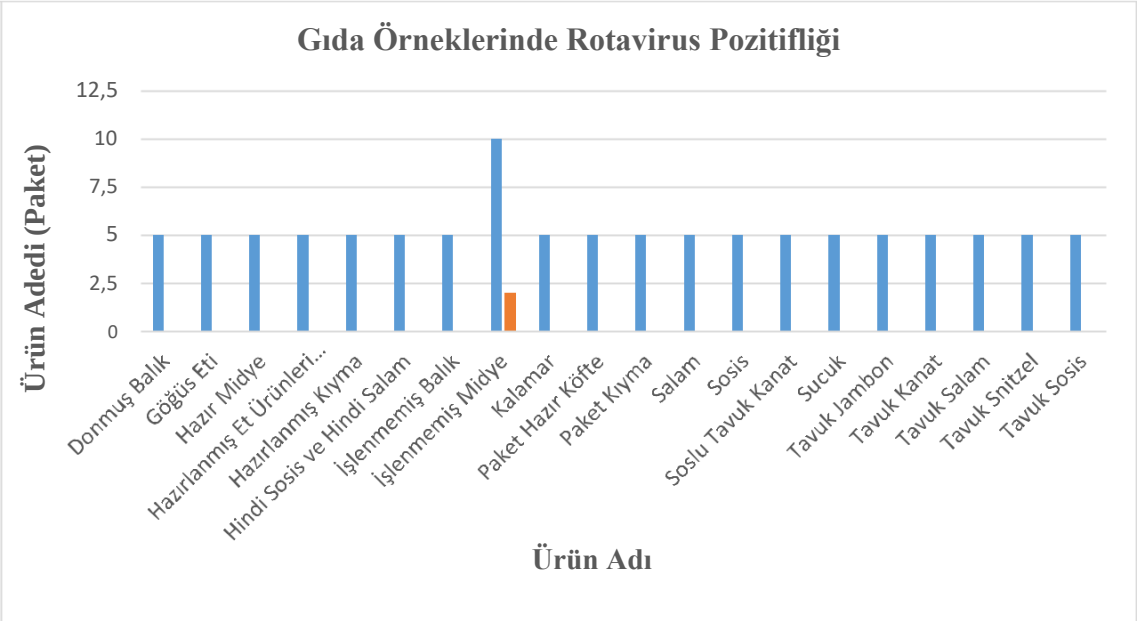


ġekil 16: Pozitif kontrolün hücre kültüründe CPE oluĢumları

A: Negatif Kontrol B:İkinci gün, C: Üçüncü gün, D:Dördüncü gün

4.4. Elde Edilen Verilerin Ġstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada 20 farklı gıda ürününden oluşan ve toplam 105 adet gıda paketini oluşturan numunelerde RT-PCR ile rotavirus varlığı araştırıldı ve 10 paket olarak incelenen işlenmemiş midye ürün paketlerinin 2 tanesinde rotavirus varlığı saptandı (Şekil 17). Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç taşımadığı ($p > 0.05$) belirlendi.



Şekil 17: Gıda Örneklerinde Rotavirus Pozitifliği

Yapılan incelemede 2 örnek (işlenmemiş midye, turuncu renk ile gösterilmiştir) rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur. Tüm örnekler için yapılan istatistiksel analizler Cochran Q teste göre yapılmıştır ($p > 0.05$).

5. TARTIğMA

Rotavirus, 5 yaşın altındaki çocuklarda akut gastroenteritlerin en yaygın nedenidir ve dünya genelinde her insan 5 yaşına gelene kadar en az bir kere rotavirus infeksiyonunu geçirmektedir (Parashar ve ark., 2009; Tate ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar 5 yaş altı çocukların %95'inin rotavirus yönünden seropozitif olduğunu ortaya koymuştur (Velazquez ve ark., 1996; Glass ve ark. 1996). Bununla birlikte infeksiyon geçiren bireylerin %30'unun aynı anda en az 2 değişik rotavirus suşuyla infekte olabildiği bildirilmiştir (Tcheremenskaia ve ark., 2007). 2008 yılında dünya genelinde rotavirus infeksiyonuna bağlı ishal vakaları, 5 yaşın altındaki 453.000 çocuğun ölümüyle sonuçlanmıştır. Bu sayı ishale bağlı ölümlerin %37'si ve 5 yaşından küçük çocuklarda görülen tüm ölümlerin %5'ini oluşturmaktadır (Tate ve ark., 2011). Rotavirusun görülme sıklığı incelendiğinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin arasında önemli bir fark görülmemesine karşın, gelişmekte olan ülkelerdeki ölüm oranı gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir (Parashar ve ark., 2003; 2006).

Ülkemizde de gastroenteritlere neden olan patojenlerin araştırıldığı birçok çalışmada rotavirusun yaygın görülen bir etken olduğu ortaya konulmuştur. Albayrak ve ark. (2009) gastroenterit şikayeti olan hastalardan toplanan dışkı örneklerinde viral etkenleri araştırmış ve norovirustan sonra en yaygın görülen ikinci etkenin rotaviruslar olduğunu bildirmişlerdir. Ece ve ark. (2012) İzmir'de 1112 dışkı örneğinde rotavirus ve adenovirusun varlığını araştırmış; %18 oranında rotavirus, %1,2 oranında adenovirus pozitifliği saptandığını bildirmişlerdir. Biçer ve ark. (2014) İstanbul'da gastroenterit şikayetiyle başvuran 644 hastadan alınan numuneleri viral ve bakteriyel etkenler yönünden araştırmış, rotavirusun en yaygın görülen gastroenterit etkeni olduğu bildirilmiştir. Balkan ve ark. (2016) gastroenterit şikayetiyle hastaneye başvuran 216 çocuğun dışkılarında bakteriyel, paraziter ve viral etkenlerin araştırıldığı çalışmalarında 88 vakanın (%40,7) rotavirustan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Tapısız ve ark. (2019) tarafından 1987-2016 yılları arasında gastroenteritlerle ilgili ülkemizde bildirilen 98 araştırma incelenmiş ve ishal şikayetiyle hastaneye başvuran 117.741 çocuk vakasının arasında 26.566'sının (%22,56) rotavirus yönünden pozitif olduğu ve bu vakaların %31,8'inin 5 yaşın altındaki çocuklarda görüldüğünü bildirmişlerdir.

Rotavirusun kontamine gıdalar ile insanlara bulaşabildiği bilinmektedir (Koopmans ve Duizer 2004). Gıdalar, çiftikten veya tarladan soframıza kadar olan

serüvenlerinin herhangi bir noktasında rotaviruslarla kontamine olabilmektedir. Sebze ve meyvelerin üretim döneminde kullanılan virusla kontamine suyla, ürünün yetiştirilme döneminde yağışlarla drenajdan taşma yoluyla gelen kanalizasyon suyu ile ve sevkiyattan önce ürünü temizlemek için kullanılan durulama suyu ile gıda ürünleri virusla kontamine olabilmektedir. Bazı ürünler için hasat, paketleme veya hazırlık sırasında ürünü işleyen işçilerin ellerinden doğrudan kontaminasyon olabilmektedir (Smulders ve ark., 2013).

Ürün sevkedilip tüketim için son tüketiciye ulaşana kadar toplu tüketim yerlerinde, büfe ve kantinlerde de virusla kontamine olabilmektedir. Bu tür bulaşmanın en önemli kaynağı infekte gıda çalışanlarıdır. Koopmans ve Duizer (2004)'e göre, belgelenmiş çoğu gıda kaynaklı viral salgınlar, endüstriyel olarak işlenmiş gıdalardan ziyade elle işlenen yiyeceklerden kaynaklanmaktadır. Kişisel hijyen kurallarına uymayan bir gıda çalışanı fekal-oral yolla bulaşmaya zemin hazırlayacak şekilde gıda ürünlerini kontamine edebilir. Aynı zamanda kusma sonucu gıda veya gıdanın işlendiği mutfakta bulunan tezgah, lavabo, bıçak gibi ekipmanların virusa maruz kalmasıyla gıdaların çapraz kontaminasyonu meydana gelebilmektedir. Bazı salgınlar, infekte gıda çalışanının kusmuğundan gıda ürünlerinin kontaminasyonuna bağlanmıştır (Caul ve ark., 1993). Doğrudan bulaşmanın yanı sıra, kusma ile üretilen aerosollere maruz kalan yiyecekler veya yüzeylerin kontaminasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (Seymour ve Appleton., 2001; Koopmans ve Duizer., 2004).

Az sayıda rotavirus insanlarda infeksiyon oluşturmak için yeterlidir. İnfekte insanlar dışkılarıyla 10^{10}/gram virus partikülü saçabilmektedir ve homolog bir konakçının infeksiyonu için 10 virion yeterlidir (Greenberg ve Estes, 2009). Yetişkin bireylerde rotavirus infeksiyonun çoğunlukla asemptomatik seyrettiği bilinmektedir (Estes ve Kapikian, 2007; Greenberg ve Estes, 2009). Bu durum, gıda işletmelerinde yetersiz kişisel hijyeni sonucunda görülen bazı salgınları açıklayabilir. Bir işletmede çalışan kontaminasyon kaynağı kişilerin hiçbir semptom göstermemelerine rağmen büyük miktarlarda virus saçabildikleri bildirilmiştir (Greenberg ve Estes, 2009; Smulders ve ark., 2013).

2003 yılında bir kruvaziyer gemisinde meydana gelen akut gastroenterit salgınında hastalardan alınan örnekler RT-PCR ile incelendiğinde rotavirusla birlikte aynı zamanda norovirus ve sapovirus varlığı da değişik hastalarda tespit edilmiştir. Gemide bulunan yolcuların son 2 günde tükettiği yiyecekler incelendiğinde hastalık

belirtisi gösteren kişilerin diğer yolculara oranla daha fazla salata ürünleri tükettiği belirlenmiş ve mevcut gastroenterit vakasının kaynağı salata ürünleriyle ilişkilendirilmiştir (Gallimore ve ark., 2005).

Japonya'nın bazı bölgelerindeki okullarda akut gastroenterit vakası görülmüş ve yapılan çalışmalar öğle yemeklerinden kaynaklanabilecek rotavirus bağlantılı bir vaka olarak tanımlanmıştır (Hara ve ark., 1978). Yine Japonya'nın Fukui kentinde bulunan 7 ilkokulda 3000 kişinin etkilendiği benzer bir gastroenterit vakasının kaynağının rotavirus olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada herhangi bir gıda maddesinde veya suda virusun varlığı saptanmamasına rağmen 7 okula da tek bir yerden öğle yemeği dağıtıldığı için virusun gıda kaynaklı olduğu yorumu yapılmıştır (Matsumoto ve ark., 1989).

Almanya'da bir anne-çocuk sanatoryumunda meydana gelen rotavirus salgınında tesisin mutfağından alınan 74 adet gıda numunesi rotavirus yönünden test edilmiştir. Patates salatasında rotavirusun varlığı RT-seminested-PCR ile tespit edilmiş ve hasta bir çocuğun dışkı numunesinde bulunan rotavirus ile sekans analizi yapılıp virusların aynı genetik karaktere sahip olduğu belirlenmiştir (Mayr ve ark., 2009).

Kanada'da yapılan bir çalışmada tarlada yetiştirilen ve yakınlarda bir nehirden sağlanan suyla sulanan çileklerde insan rotavirusu ile birlikte domuz hepatit E virusu ve norovirus da moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir (Brassard ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada rotaviruslar, marulda gram başına 10.000 virion konsantrasyonunda bulunmuştur ve muhtemel kontaminasyon kaynağının, sebzeleri yıkamak için kullanılan güvenli olmayan su olduğu bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 1997).

Biz bu çalışmamızda, gıda çalışanlarınca kontamine olabilecek hayvansal ürünlerden köfte, kebap, soslu kanat gibi numuneler; çevresel kontaminasyon kaynağının ortaya konulması için deniz mahsülleri; işletmelere bağlı oluşabilecek endüstriyel kontaminasyon için salam, sucuk, sosis; virusun zoonotik özelliği göz önüne alınarak hayvandan direkt olarak soframıza ulaşabilecek kontaminasyon ihtimalini değerlendirerek geniş yelpazede hayvansal ürünlerden numuneler toplayarak rotavirus varlığı yönünden araştırdık.

Çalışmamızda incelediğimiz 105 ürünün 35'i kırmızı et ürünlerinden hazırlanmış kıyma, paket kıyma, paket hazır köfte, sucuk, salam, sosis, kebap/köfte gibi endüstriyel üretim tesislerinden veya gıda çalışanının hazırlığı sonrasında son tüketiciye sunulan gıda ürünleri oluşturmaktadır. İncelenen bu kırmızı et ürünlerinde rotavirusun

varlığı saptanmamıştır. Kesimhanede infekte hayvanın kesiminden sonra karkasın dışkıyla kontamine olabileceği ve bu yolla insanlarda gıda kaynaklı bir bulaşma olabileceği ihtimali üzerine, Almanya‘da yapılan bir araştırmada domuz kesimhanesinden toplanan 120 dışkı örneğinin %0,8‘i rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur (Machnowska ve ark. 2014). Kanada‘da yapılan başka bir araştırmada ise yine kesimhanede kontamine olabilecek etlerde RT-qPCR ile rotavirusun varlığı incelenmiştir. Bu çalışmada etlerin hazırlanması esnasında 2 farklı işletmede ürünlerin geçtiği 4 farklı aşamada (A işletmesinde: kesim, tüylerinden temizleme, pastörizasyon ve iç organların çıkarılması; B işletmesinde: kesim, derinin yüzülmesi, iç organların çıkarılması ve yıkama) toplam 1000 adet sürüntü örneği alınmıştır. İlk aşama olan kesim işleminden sonra kesilen hayvanlardan alınan sürüntü örneklerinin A işletmesinde %100, B işletmelerinde %98 oranında rotavirus pozitif olduğu bildirilmiştir; karkasın geçirdiği bütün işlemlerden sonra A işletmesinde bu oranın %1‘e düştüğü, B işletmesinde ise hiç pozitif örneğin saptanmadığı bildirilmiştir (Jones ve Muehlhauser, 2017). Çalışmamızda incelenen ürünlerde rotavirusun varlığı saptanmamıştır fakat daha fazla sayıda ürünün incelenmesiyle sonuçların değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda hem hindi etinin hem de tavuk etininin bulunduğu 40 adet kanatlı eti orijinli örnek incelenmiştir. Yaptığımız çalışmada rotavirus yönünden pozitif bir örnek saptanmamıştır. 2018 yılında yayımlanmış, Brezilya‘da yapılan bir araştırmada Arjantin ve Uruguay sınırından ülkeye giren ve içinde hem kanatlı etlerinin hem de kırmızı etlerin bulunduğu 159 adet işlenmiş veya çiğ et ürünü rotavirus varlığı yönünden incelenmiştir. İncelenen çiğ et ürünlerinin %21.36‘sı, işlenmiş et ürünlerinin ise %30.23‘ü rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur (Pereira ve ark., 2018). Rotavirusun kanatlı hayvan çiftliklerinde çok yaygın olduğu birçok araştırmayla ortaya konulmuştur. ABD'de 2005–2006 yıllarında yapılan bir araştırmada, RT-PCR ile A grubu rotaviruslar tavuk sürülerinin %46,5'inde ve hindi sürülerinin %69,7'sinde tespit edilmiştir (Pantin-Jackwood ve ark, 2008). Tavuklarda D grubu rotavirusların varlığı da İskoçya, İsveç, Almanya, Birleşik Krallık, İtalya, Hollanda ve Mısır gibi birçok ülkede bildirilmiştir (Otto ve ark., 2012; Hemida, 2013). 2012 yılında Brezilya‘da D grubu rotavirusun tavuk çiftliklerinde görülme oranı %53 olarak bildirilmiştir (Bezerra ve ark., 2014). Tavukların gıda üretimi için yaygın olarak kullanıldığı ve bu hayvan türlerinde rotavirus infeksiyonlarının görülme sıklığının yüksek olduğu göz önüne alındığında

(Day ve ark., 2007; Otto ve ark., 2012; Pantin-Jackwood ve ark., 2008), insanların avian rotaviruslarına nispeten yüksek oranda maruz kalması beklenebilir. Bildiğimiz kadarıyla, avian rotaviruslarının insanlarda infeksiyona neden olduğuna dair bir bildirim yapılmamıştır; bununla birlikte avian rotavirusun türler arası geçişinin bildirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Mori ve ark. (2001) bir güvercinden izole edilen rotavirusu kullanarak, fareleri oral yolla deneysel olarak infekte etmiştir. Yapılan bu çalışma sonucu güvercin rotavirusunun süt emen farelerde infeksiyon oluşturabileceği ve ishale neden olabileceği gösterilerek, avian rotavirusunun deneysel olarak bir memeliye bulaşabildiğinin ilk kanıtı olarak bildirilmiştir. Almanya'da ishalli bir buzağıdan izole edilen rotavirus antijenik olarak incelenmiş, RNA-RNA hibridizasyonu ve sekanslama ile izole edilen suşun memeli rotaviruslarından çok avian rotaviruslarına benzer olduğu gösterilmiştir (Brüssow ve ark., 1992a, 1992b). Ayrıca bu suşun VP7 sekans analizi, Japon güvercin rotavirus PO-13 suşu ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve izole edilmiş olan rotavirusun buzağıyı infekte eden bir avian rotavirusu olduğu bildirilmiştir (Rohwedder ve ark., 1997). In vitro koşullarda deneysel olarak avian rotavirusun reassortment mekanizmasıyla mutasyon geçirebileceği de ortaya konulmuştur. Avian rotavirus (Ty-1) ve simian rotavirus (RRV) aynı anda MA-104 hücrelerine inoküle edilmiş, VP4 proteinin geninin simian rotavirus'dan köken aldığı, diğer 10 genin avian rotavirusa ait olduğu tespit edilen yeni bir reassortant rotavirus, hücre kültüründen izole edilmiştir (Kool ve ark., 1992). Çalışmamızda kanatlı hayvan ürünlerinde rotavirus varlığının saptanamamasının sebebi olarak örneklerin yeterli sayıda olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca 30 adet deniz mahsülü rotavirus varlığı yönünden test edilmiştir. İşlenmemiş midye örneğinden on paket, işlenmemiş balık, dondurulmuş balık, paketli midye ve kalamar ürün gruplarının her birinden beşer paket numune incelenmiştir. İncelenen ürünlerden farklı zamanlarda alınmış iki paket işlenmemiş midye numunesinde rotavirus pozitif olarak saptanmıştır. Fransa'da yapılan bir çalışmada insanlarda oluşan rotavirus kaynaklı gastroenterit olgusu yenilen kabuklu deniz ürünüyle ilişkilendirilmiştir (Guyader ve ark. 2008). İtalya'da yapılan bir araştırmada 2015-2017 yıllarında toplanan 259 kabuklu deniz ürünü incelenmiş ve %9'u rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur (Fusco ve ark., 2019). Yine İtalya'da yapılan bir araştırmada 2014-2015 yıllarında toplanan 108 kabuklu deniz ürünü incelenmiş ve %12'si rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur (Fusco ve ark., 2017).

Brezilya‘da yapılan bir çalışmada deniz kıyısından toplanan 11 adet midyenin tümünde rotavirus tespit edilmiştir (Keller ve ark., 2013). Tayland‘da yapılan bir çalışmada 110 istiridye örneğinden 6‘sı (%5,4) rotavirus yönünden pozitif bulunmuştur (Kittigul ve ark., 2014). İstanbul‘da yapılan bir çalışmada nisan ayında toplanan 52 grup (1350 adet) midye örneğinde adenovirus, astrovirus ve rotavirus varlığı multiplex real-time PCR ile araştırılmış ve hiçbir örnekte rotavirus saptanmamıştır (Ghalyoun ve Ünver Alçay, 2018). Rotavirus enfeksiyonları yılın her döneminde görülmekle birlikte kış aylarında görülme oranlarının çok daha fazla olduğu bildirilmiştir (Patel ve ark., 2013; Gündeşlioğlu ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda incelenen midyeler aralık ve ocak aylarında toplanmıştır. Bu durum, rotavirus saptanma olasılığını artmış olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda incelenen 10 midye paketinin her birinin 15 adet midye içeriyor olması, epidemiyolojik olarak yeni örneklemeler ve daha fazla sayıda midyeler ile yeni araştırmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda gıda örneklerinde rotavirusun saptanması için, rotavirusların VP7 ve VP4 gen bölgeleri RT-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. İncelenen örneklerde saptanan rotavirusların G/P tiplendirilmesi VP7 ve VP4 gen bölgelerinin sekans analizleriyle belirlenmiştir. VP7 gen bölgesi amplifikasyonu için sBeg9/End9 primerleri (Gouvea ve ark. 1994; Hasöksüz ve ark.,2008), VP4 gen bölgesi amplifikasyonu için ise Con3/Con2 primerleri kullanılmıştır (Gentsch ve ark., 1992). Brezilya‘da et ürünlerinde rotavirus kontaminasyonu araştırılırken VP6 gen bölgesi RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir (Pereira ve ark., 2018). Kanada‘da domuz etlerinde rotavirus varlığına dair çalışma real-time RT-PCR yöntemiyle NSP3 gen bölgesi araştırılarak yapılmıştır (Jones ve Muehlhauser, 2017). İtalya‘da kabuklu deniz ürünleri rotavirusun varlığı NSP3 gen bölgesinin real-time RT-PCR yöntemiyle araştırılmasıyla ortaya konmuştur (Fusco ve ark., 2019). Tayland ve Brezilya‘da yapılan iki ayrı çalışmada midyelerde ve deniz suyunda rotavirus varlığının tespitinde RT-nested-PCR yöntemi kullanılarak VP7 gen bölgesi araştırılmıştır (Kittigul ve ark., 2014; Keller ve ark., 2013). Yunanistan‘da 2012 yılında ortaya çıkan ve 3600 kişiyi etkileyen gastroenterit salgınında su numunelerinin rotavirus yönünden pozitif olduğu tespit edilmiş ve bu çalışmada da bizim kullandığımız primerler ile VP4 ve VP7 gen bölgeleri RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır (Mellou ve ark., 2014). Almanya‘da bir anne-çocuk sanatoryumunda meydana gelen salgında hem dışkı örnekleri hem de yemekhanede sunulan gıda örneklerinde rotavirusun VP7 gen bölgesi one-step RT-seminested PCR yöntemiyle

araştırılmıştır (Mayr ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda olduğu gibi moleküler teşhis metodlarının kullanıldığı tarama çalışmalarında, duyarlılığı yüksek yöntemlerin kullanılması önem arz etmektedir. Real-time RT-PCR metodu bu yönüyle konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılığı ve spesifitesi daha yüksek olan, kapalı sistemle kontaminasyon riskini minimuma indiren, kısa sürede sonuç alınabilen bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada domuz rotavirusunun saptanmasında real-time RT-PCR ve konvansiyonel nested RT-PCR metodları karşılaştırılmış ve aynı primerler kullanıldığında real time RT-PCR metodunun konvansiyonel RT-PCR metodundan 1000 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Pang ve ark. 2004). Bunun yanında real-time RT-PCR metodu konvansiyonel RT-PCR metoduna nazaran daha pahalı bir sistem olarak öne çıkmaktadır. Biz çalışmamızda projemizin bütçesi çerçevesinde güvenilir bir yöntem olan konvansiyonel RT-PCR metodunu kullandık.

Çalışmamızda işlenmemiş iki midye grubu numunesinin rotavirus yönünden pozitif olduğu belirlenmesi ardından tespit edilen rotavirus örneklerinin birisine Sanger yöntemiyle hem VP4 hem de VP7 gen bölgeleri forward ve reverse olmak üzere iki yönlü dizileme işlemi uygulanmıştır. Rotavirusların G/P tiplendirilmesi için virusun VP7 ve VP4 genlerinin sekansları kullanıldığından dolayı çalışmamızda tercih ettiğimiz VP4 ve VP7 bölgesi için kullanılan primerler aynı zamanda sekans primerleri olarak kullanılmıştır. Sekans analiz sonucuna göre G/P tiplendirmesi yapılan örneğin, A grubu insan rotavirusunun G1[P8] genotipi olduğu belirlenmiştir. Bu genotip insanların rotavirus infeksiyonlarında yaygın görülen bir genotip olduğu araştırıcılar tarafından bildirilmiştir. 1989-2004 yılları arasında rotavirusun G ve P tiplendirmesi ile ilgili yapılan yayınlarda insanlardan alınan örneklerden tespit edilen 16.474 rotavirus içerisinde G1[P8] genotipi tek başına Kuzey Amerika, Avustralya ve Avrupa'da rotavirus infeksiyonlarının %70'inden fazlasından, Güney Amerika ve Asya'da infeksiyonların yaklaşık % 30'undan ve Afrika'da yaklaşık %23'ünden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Santos ve ark., 2005). 1996-2007 yılları arasında yayınlanan araştırmaları derleyen başka bir yayında insanlardan toplanan örneklerden saptanan 110.099 rotavirusun %42.9‘unu G1 genotipinin oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı yayında G ve P kombinasyonları incelendiğinde, 73.811 rotavirus genotipinin %37,70‘ini G1[P8] kombinasyonun oluşturduğu bildirilmiştir (Banyai ve ark., 2012). 2007-2012 yılları arasında bildirilen verilere göre Avrupa, Afrika, Amerika, Batı Pasifik Bölgesi, Güney Doğu Asya ve Doğu Akdeniz Bölgelerinin herbirinde G1[P8] en çok görülen genotip

olmuştur ve toplam 46.967 suşun %31.15‘ini oluşturmuştur (Doro ve ark., 2014). 2004-2006 yılları arasında Orta ve Güneydoğu Avrupa ülkelerinden Çekya, Slovenya, Hırvatistan, Arnavutluk ve Bulgaristan‘ı kapsayan bir çalışmada rotavirus yönünden pozitif olduğu bilinen 1.500 örnek genotiplendirilmiştir. Bu çalışmada dünya genelinde yaygın görülen tip olan G1[P8] Slovenya, Hırvatistan ve Çekya‘da genel orana paralel olarak yüksek miktarlarda görülürken (%21.8-%46.3), Arnavutluk ve Bulgaristan‘da bu oranın düşük olduğu tespit bildirilmiştir (%8.9-7.1) (Tcheremenskaia ve ark., 2007). Ülkemizde insan rotavirusları konusunda yapılan çalışmalarda Ceyhan ve ark. (2009) 179 pozitif örneğin 128‘inin, Bozdayı ve ark. (2008) 128 pozitif örneğin 71‘inin, Altındiş ve ark. (2016) 238 pozitif örneğin 100‘ünün G1[P8] genotipinde olduğu ve en sık görülen genotip olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında Tapısız ve ark. (2011) 100 pozitif örnek içinde 7, Durmaz ve ark. (2014) 2102 pozitif örnek içerisinde 355, Bozdayı ve ark. (2008) 241 pozitif örnek içerisinde 36 örneğin G1[P8] genotipinde olduğu ve bu çalışmalarda G9[P8] genotipinden sonra en sık görülen ikinci kombinasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda midyelerde saptanan rotavirusun, A grubu insan rotavirusu olması ve ürünlerin çiğ olması, bu bulaşının bir gıda çalışanından kaynaklanmadığı, çevresel kontaminasyonla meydana geldiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda incelenen midyelerin uygun olmayan bir bölgeden, muhtemelen şehir kanalizasyonunun veya kanalizasyonla bulaşık bir akarsuyun denizle buluştuğu bölgeden toplandığı; midyelerin suyu filtreleyerek beslenmelerinden dolayı kontamine bölgede yaşamını sürdürürken kanalizasyonda bulunan rotavirus etkenini bünyesinde konsantre ettiği düşünülmektedir.

Rotavirus yönünden pozitif bulunan gıda örneklerinden hücre kültüründe izolasyon çalışması yapılmıştır. Rotavirusların in vitro olarak izole edilmesi ve çoğaltılması genellikle zordur; bu nedenle virus izolasyonu, rotavirusu teşhis etmek için bir yöntem olarak kullanılmamaktadır (Babiuk ve ark., 1977). Rotavirusun proteaza duyarlı VP4 spike proteini enzimle girdiği etkileşim sonucu VP5 ve VP8 içine proteolitik olarak ayrılır (Estes ve ark., 1981; McDonald ve Patton, 2011). Bu işlem sonucu virusun hücreye bağlanma mekanizması aktive edilmiş olur. Bu mekanizmadan faydalanarak rotavirusun in vitro izolasyonunda genellikle tripsin veya pankreatinle ön işlem uygulanmaktadır. Babiuk ve ark. (1977) bovine rotavirusu BSC-1 hücrelerinde tripsin varlığında ve tripsin eklemeden inoküle edip sonuçları karşılaştırdıklarında tripsin kullanılarak ekilen virusun titresinin çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Rotavirusun izolasyon çalışmalarında birçok değişik hücre kültürü kullanılmış en uygun kültürün afrika yeşil maymun böbrek hücresi olan MA-104 hücresi olduğu belirlenmiştir. McNulty ve ark. (1977) BHK-21, Vero, PK-15, MDBK, primer dana böbreği ve primer dana testis hücrelerine bovine rotavirus ekimleri yapmışlar ve sadece MDBK ve primer dana böbreği hücrelerinde CPE oluşumu gözlemlemişlerdir. Estes ve ark. (1979b) hücre kültürüne adapte maymun rotavirusunu değişik maymun böbrek hücrelerinden köken alan hücrelere inoküle ederek infeksiyöz etkisini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada MA-104, CV-1 ve BSC-1 hücrelerine ekilen maymun rotavirusunun yüksek oranda CPE oluşturduğu gözlemlenirken, primer afrika yeşil maymun böbreği hücreleri (AGMK) ve primer maymun böbreği (RhMK) hücrelerinde CPE yaygınlığının %50 oranında kaldığı, Vero hücrelerinde ise CPE oluşumu gözlemlenmediği belirtilmiştir. Kutsuzawa ve ark. (1982b) insan rotavirusunu tripsin varlığında MA-104 hücrelerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hoshino ve ark. (1982) canine rotavirusu MA-104 hücrelerinde tripsin kullanarak izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sato ve ark. (1981) insan rotavirusunu tripsinle ön işleme tabi tuttuktan sonra MA-104 hücrelerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Gülyaz ve ark. (2005) sığır rotavirus izolasyonunda tripsin yerine pankreatin kullanmış ve sığır rotavirusu MA-104 hücrelerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda pozitif midye örneklerimizden rotavirus izolasyonu için tripsin varlığında MA-104 hücrelerine inoküle ettik ve 5 kör pasaj boyunca CPE oluşumu yönünden takip ettik. Her bir pasajda beşer günlük inkübasyon süresi sonucunda hücre kültürlerinde herhangi bir CPE gerçekleşmedi. Bu sonuçla midye örneklerinde saptanan rotavirusun infeksiyöz olmadığı, inaktif olduğu düşünüldü.

Yapılan çalışmada 20 farklı gıda ürününden oluşan ve toplam 105 adet gıda paketini oluşturan numunelerde RT-PCR ile rotavirus varlığı araştırıldı ve 10 paket olarak incelenen işlenmemiş midye ürün paketlerinin 2 tanesinde rotavirus varlığı saptandı. Cochran Q testi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç taşımadığı ($p > 0.05$) belirlendi. Daha fazla numune sayısı ile yapılacak araştırmaların istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar oluşturacağı düşünülmektedir.

Rotaviruslar, çeşitli koşullar altında gıdalarda ve çevrede uzun süre infeksiyöz etkisini koruyabilmekte ve çok kolay bir şekilde kişiden kişiye bulaşabilmektedir (Mayr ve ark., 2009). Yapılan birçok araştırma rotavirusun insanların ellerinde, eşyalarda,

gıdalarda ve hatta havada uzun süre infeksiyöz etkisini koruduğunu göstermiştir. pH 3-9 değerleri arasında stabil olduğu (Carter, 2005) ve uygun nem ortamında havada 9 gün aktif olabileceği bildirilmiştir(Sattar ve ark., 1984). Ansari ve ark. (1988) rotavirusun ellerle çevreye taşınabildiğini ortaya koymak için yaptıkları çalışmada virusun birkaç saat boyunca deride infeksiyöz etkisini koruduğunu bildirmişlerdir. Moe ve Shirley (1982) evde ortalama koşullar olan %30 bağıl nem ve 20 ˚C'de rotavirusun bir haftaya kadar dayanabildiğini tespit etmişlerdir. Rapheal ve ark. (1985), 4˚C suda 64 gün boyunca rotavirusun titresinde herhangi bir düşüş olmadığını, bunun yanında 20 ˚C'de onuncu günde %99 düşüş olduğunu kaydetmişlerdir. Badawy ve ark. (1985) rotavirusun buzdolabı koşullarında marul ve turp üzerinde 30 gün, havuçta ise 25 güne kadar, oda sıcaklığında ise marulda 25, turpta 4, havuçta 15 kadar infeksiyöz etkisini koruduğunu bildirmişlerdir. Rotavirusun cam, plastik ve paslanmaz çelik gibi cansız yüzeylerde oda sıcaklığında 10 günden fazla bir süre canlı kaldığı gösterilmiştir (Ansari ve ark., 1991). Rotavirus tuvalet kapı kolları, televizyonlar, oyuncaklar ve hastaların ellerinde tespit edilmiştir (Akhter ve ark., 1995). Rotavirusların çevrede uzun süre infektif özelliğini koruyabilmesi, virus ile kontamine olmuş gıda maddelerinin uluslararası transferine de sebep olabilmektedir (Badawy ve ark., 1985).

Sonuç olarak, rotavirusun dayanıklılığı, zoonoz bir etken olması, insanlar arasında hem temas ile hem de gıda yoluyla fekal-oral yolla bulaşabilmesi, çeşitli yollarla soframıza ulaşmasını mümkün kılmaktadır. Rotavirusun gıda yoluyla insanlara ulaşmasını engelleme stratejisi, gıdanın ilk üretim yerinden başlayarak son tüketiciye sunulduğu noktaya kadar bir dizi önlem içermelidir. Hayvansal ürünler göz önünde bulundurulduğunda her ne kadar hastalık semptomları gösteren hayvanların kesimine izin verilmemesi bir önlem olsa da asemptomatik seyreden bir olguda etin kontaminasyonu mümkündür. Tüketilen etlerin ve deniz mahsüllerinin az pişmiş olması rotavirus infeksiyonları için riski arttıracaktır.

Deniz mahsüllerinden kabuklu deniz ürünleri, filtreleme sistemiyle beslendikleri için bünyelerinde rotavirusu konsantre edebilmektedir. Gıda tüketimi için toplanacak ürünlerin yerleşim yerlerinden ve kanalizasyonun denizle birleştiği noktalardan uzak bölgelerden toplanması önemlidir. Yasadışı midye toplama faaliyetleri sonucu şehir merkezindeki kıyılardan toplanan midyeler rotavirusun soframıza ulaşma riskini arttırmaktadır. Midye üretim çiftliklerinin yaygınlaştırılması midyenin kontrollü bir şekilde gıda ürünü olarak sunulmasında fayda sağlayacaktır.

Rotavirus, 5 yaşın altındaki çocuklar için şiddetli gastroenteritlere neden olur. Çalışmamızda rotavirusla kontamine olduğunu saptadığımız midyeler, ürün grubu olarak 5 yaş altı çocukların tükettiği gıdalar arasında genellikle yer almamaktadır fakat bu durum midyenin kontaminasyonun toplum sağlığı açısından risk oluşturmadığı anlamına gelmememektedir. Unutulmamalıdır ki kontamine gıdaları tüketen bir yetişkin hastalığı asemptomatik seyirde atlatırken çevresine yüksek miktarlarda rotavirus saçabilir ve 5 yaş altı çocukların veya duyarlı bireylerin şiddetli seyreden gastroenterit vakalarına sebep olabilir.

Araştırmamız sonucunda saptadığımız rotavirusun G1 genotipi ülkemizde kullanılan aşılarda bulunan suşlarla aynı tiptedir fakat yaptığımız literatür taramalarında G9 genotipinin dünyada gittikçe yaygınlaştığı, son zamanlarda ülkemizde de yapılan araştırmalarda yaygın genotip haline geldiği görülmüştür. Şu anda ülkemizde kullanımda olan rotavirus aşı suşlarında G9 genotipi bulunmamaktadır. Her ne kadar rotavirusa karşı immunizasyon stratejileri heterotipik bağışıklık olgusuna dayansa da, G9 genotipini de içeren bir polivalan aşının kullanılması rotavirus infeksiyonlarıyla mücadelede daha faydalı olabilir.

Öneriler:

1- Kabuklu deniz mahsüllerinin toplanma faaliyetleri kontrol altına alınmalı, uygun koşullarda gıda olarak hazırlanması sağlanmalıdır.
2- Midye üretim çiftlikleri yaygınlaştırılmalıdır.
3- Kanalizasyon sularının deniz suyuna karışabileceği bölgeler belirlenip bu konuda ıslah çalışmaları yapılmalıdır.
4- Tarım yapılan arazilerde kullanılan suyun kanalizasyonla bulaşık olmayan temiz kaynaklardan sağlanması gerekmektedir.
5- Hayvansal gıdaların tüketilmeden önce yeterli sıcaklıkta pişirilmesi sağlanmalı bununla ilgili kamu spotlarıyla bilgilendirmeler yapılmalıdır.
6- Çocuklarda saptanan rotavirusların genotipleri düzenli olarak takip edilmeli ve kullanılacak aşılar bu verilere göre belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

Abad, F. X., Pintó, R. M., Bosch, A. (1997). Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiology Letters*, 156(1), 107-111.

Akhter, J., Al-Hajjar, S., Myint, S., Qadri, S. H. (1995). Viral contamination of environmental surfaces on a general paediatric ward and playroom in a major referral centre in Riyadh. *European journal of epidemiology*, 11(5), 587-590.

Albayrak, N., Yağcı Çağlayık, D., Altaş, A. B., Korukluoğlu, G., Ertek, M. (2011). Evaluation of the results of acute viral gastroenteritis data in Refik Saydam National Public Health Agency, Virology Reference and Research Laboratory in 2009. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 68(1), 9-15.

Alfieri, A. A., Leite, J. P. G., Nakagomi, O., Kaga, E., Woods, P. A., Glass, R. I., Gentsch, J. R. (1996). Characterization of human rotavirus genotype P [8] G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Archives of virology*, 141(12), 2353-2364.

Altindis, M., Ahsan, F., Van Der Veer, B., Eryegen, K., Hacimustafaoglu, M., Ipek, I. ve ark. (2012). A novel study on rapid molecular characterisation of group A rotavirus in Turkey using PCR-reverse line blot hybridisation: P952. *Clinical Microbiology & Infection*, 18, 214-215.

Altındiş, M., Küçükkurt, Ş., Kalaycı, R., Aslan, F., Bükülmez, A., ve Yoldaş, Y. (2016). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus, enterik adenovirus ve norovirus sıklığı. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 1-12.

Angel, J., Franco, M. A., Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews microbiology*, *5*(7), 529-539.

Ansari, S. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Wells, G. A., Tostowaryk, W. (1988). Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *Journal of clinical microbiology*, 26(8), 1513-1518.

Ansari, S. A., Springthorpe, V. S., Sattar, S. A. (1991). Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Reviews of infectious diseases*, 13(3), 448-461.

Arias, C. F., Isa, P., Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., López, T ve ark. (2002). Molecular biology of rotavirus cell entry. *Archives of medical research*, 33(4), 356-361.

Armah, G. E., Sow, S. O., Breiman, R. F., Dallas, M. J., Tapia, M. D., Feikin, D. R., ve ark. (2010). Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 376(9741), 606-614.

Arnold, M., Patton, J. T., McDonald, S. M. (2009). Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Current protocols in microbiology*, 15(1), 15C-3. Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald, C., Desselberger, U., Burrone, O. R. (2007). Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *Journal of virology*, 81(5), 2128-2137.

Au, K. S., Mattion, N. M., Estes, M. K. (1993). A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*, 194(2), 665-673.

Avcı, K., Akgün, L., Özçelik, R., Elbi, H., Altındiş, M. (2013). Bir hepatit A salgınının incelenmesi; Afyonkarahisar, Kocaöz kasabası, 2013. *Viral Hepatit Dergisi* 2013; 19(1): 58-61

Avrupa Komisyonu. (2005). Regulation of the European Parliament of 15 November on microbiological criteria for foodstuffs, 2073/2005/CE. Official Journal.

Baert, L., Debevere, J., Uyttendaele, M. (2009). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 83-94.

Babiuk, L. A., Mohammed, K., Spence, L., Fauvel, M., Petro, R. (1977). Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(6), 610-617.

Badaracco, A., Garaicoechea, L., Matthijnssens, J., Parreño, V. (2014). Epidemiology of Rotavirus Infection in cattle, small ruminants and horses. Rotavirus Infections. *Nova Science Publishers*, Inc., New York, 79-116.

Badawy, A. S., Gerba, C. P., Kelley, L. M. (1985). Survival of rotavirus SA-11 on vegetables. *Food Microbiology*, 2(3), 199-205.

Balkan, Ç. E., Karameşe, M., Çelebi, D., Aydoğdu, S., Çalık, Z., Yılmaz, Y. (2016). Acute gastroenteritis agents among 0–5 years-old turkish children. *Kafkas J Med Sci,* 6(2), 94-7.

Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q. Y., Morris, A. P., Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272(5258), 101-104.

Banyai , K., László, B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A. S., Gentsch, J. R., Parashar, U. D. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, 30, A122-A130.

Banyai , K., Estes, M. K., Martella, V., Parashar, U. D. (2018). Viral gastroenteritis. *The Lancet*, 392(10142), 175-186.

Bardhan, P. K., Salam, M. A., Molla, A. M. (1992). Gastric emptying of liquid in children suffering from acute rotaviral gastroenteritis. Gut, 33(1), 26-29.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology*, 12(9), 2385-2397.

Bernstein, D. I., Glass, R. I., Rodgers, G., Davidson, B. L., Sack, D. A., Anderson, E., ve ark. (1995). Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. *Jama*, 273(15), 1191-1196.

Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of virology*, 77(3), 1757-1763.

Beuret, C., Baumgartner, A., Schluep, J. (2003). Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2292-2297.

Bezerra, D. A. M., da Silva, R. R., Kaiano, J. H. L., de Souza Oliveira, D., Gabbay, Y. B., Linhares, A. C., Mascarenhas, J. D. A. P. (2014). Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. *Avian Pathology*, 43(3), 238-243.

Bhandari, N., Sharma, P., Glass, R. I., Ray, P., Greenberg, H., Taneja, S., ve ark. (2006). Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: results of a randomised controlled trial. *Vaccine*, 24(31-32), 5817-5823.

Bhandari, N., Rongsen-Chandola, T., Bavdekar, A., John, J., Antony, K., Taneja, S. ve ark. (2014). Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in

Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 383(9935), 2136-2143.

Bicer, S., Col, D., Erdag, G. C., Giray, T., Gurol, Y., Yilmaz, G., ve ark. (2014). A retrospective analysis of acute gastroenteritis agents in children admitted to a university hospital pediatric emergency unit. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(4).

Bishop, R., Davidson, G. P., Holmes, I. H., Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281-1283.

Bishop, R. F., Barnes, G. L., Cipriani, E., Lund, J. S. (1983). Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective longitudinal study in young children. *New England Journal of Medicine*, 309(2), 72-76.

Bomsel, M., ve Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(1), 57-68.

Boxman, I. L., Verhoef, L., Dijkman, R., Hägele, G., Te Loeke, N. A., Koopmans, M. (2011). Year-round prevalence of norovirus in the environment of catering companies without a recently reported outbreak of gastroenteritis. *Applied and environmental microbiology*, 77(9), 2968-2974.

Bozdayi, G., Dogan, B., Dalgic, B., Bostanci, I., Sari, S., Battaloglu, N. O ve ark. (2008). Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *Journal of medical virology*, 80(4), 733-740.

Bozkurt, H., D'Souza, D. H., Davidson, P. M. (2015). Thermal inactivation of foodborne enteric viruses and their viral surrogates in foods. *Journal of food protection*, 78(8), 1597-1617.

Brassard, J., Gagné, M. J., Généreux, M., & Côté, C. (2012). Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. Applied and environmental microbiology, 78(10), 3763-3766.

Browning, G. F., Chalmers, R. M., Snodgrass, D. R., Batt, R. M., Hart, C. A., Ormarod, S. E. ve ark. (1991). The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine veterinary journal*, 23(6), 405-409.

Browning, G. F. ve Begg, A. P. (1996). Prevalence of G and P serotypes among equine rotaviruses in the faeces of diarrhoeic foals. *Archives of virology*, 141(6), 1077-1089.

Brüssow, H., Nakagomi, O., Gerna, G., Eichhorn, W. (1992a). Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 67-73.

Brüssow, H., Nakagomi, O., Minamoto, N., Eichhorn, W. (1992b). Rotavirus 993/83, isolated from calf faeces, closely resembles an avian rotavirus. *Journal of general virology*, 73(7), 1873-1875.

Buesa, J., Collado, B., Lopez-Andujar, P., Abu-Mallouh, R., Diaz, J. R., Diaz, A. G. ve ark. (2002). Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2854-2859.

Burke, R. M., Tate, J. E., Kirkwood, C. D., Steele, A. D., Parashar, U. D. (2019). Current and new rotavirus vaccines. Current opinion in infectious diseases, 32(5), 435.

Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., Burrone, O. R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *Journal of General Virology*, 86(5), 1481-1487.

Carter, M. J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of applied microbiology*, 98(6), 1354-1380.

Caul, E. O., Sellwood, N., Brown, D., Curry, A., Humphrey, T. J., Hutchinson, D. N., ... & Sharp, I. R. (1993). Outbreaks of gastroenteritis associated with SRSVs. *PHLS Microbiol Dig*, 10, 2-8.

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

Centers for Disease Control and Prevention. 2014. 2011 Estimates of foodborne illnesses in United States. Erişim 08.03.2020, https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html

Ceyhan, M., Alhan, E., Salman, N., Kurugol, Z., Yildirim, I., Celik, U. ve ark. (2009). Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005–2006: a hospital-based study. *The Journal of infectious diseases*, *200*(Supplement_1), S234-S238.

Chan, M. C., Sung, J. J., Lam, R. K., Chan, P. K., Lee, N. L., Lai, R. W., & Leung, W. K. (2006). Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*, 12(8), 1278.

Chauhan, R. S., & Singh, N. P. (1996). Epidemiology of rotavirus infection in calves. *International Journal of Animal Sciences*, 11(1), 221-223.

Chen, Y. S., ve Vaughn, J. M. (1990). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Applied and environmental microbiology*, 56(5), 1363-1366.

Chironna, M., Lopalco, P., Prato, R., Germinario, C., Barbuti, S., Quarto, M. (2004). Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2825-2828.

Chrystie, I. L., Totterdell, B. M., & Banatvala, J. E. (1978). Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *The Lancet*, 311(8075), 1176-1178.

Ciarlet, M., Reggeti, F., Piña, C. I., & Liprandi, F. (1994). Equine rotaviruses with G14 serotype specificity circulate among venezuelan horses. *Journal of clinical microbiology*, 32(10), 2609-2612.

Collins, P. J., Cullinane, A., Martella, V., & O'Shea, H. (2008). Molecular characterization of equine rotavirus in Ireland. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3346-3354.

Conner, M. E., & Darlington, R. W. (1980). Rotavirus infection in foals. *American journal of veterinary research*, 41(10), 1699-1703.

Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., & Burrone, O. R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *Journal of General Virology*, 91(7), 1782-1793.

Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L., & Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*, 48(4), 289-302.

Cooke, A. R. (1975). Control of gastric emptying and motility. *Gastroenterology*, 68(4), 804-816.

Cooksley, W. G. E. (2000). What did we learn from the Shanghai hepatitis A epidemic?. *Journal of viral hepatitis*, 7, 1-3.

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

Criglar, J. M., Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Broughman, J. R., Prasad, B. V., Estes, M. K. (2014). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of Virology*, 88(2), 786-798.

Currier, M. (1996). Foodborne outbreak. Dairy Food Environ. Sanitation, 16, 32-33.

Çan, G., Yavuzyılmaz, A., Çınarka, H., Dereli, M., Topbaş, M., & Özgün, Ş. (2011). Trabzon İli Sürmene İlçesi Norovirüs Salgını İncelemesi-Temmuz 2010. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 10(5).

Çataloluk, O., Iturriza, M., Gray, J. (2005). Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiology & Infection*, 133(4), 673-678.

Çiftçioglu G., Hasöksüz M, Issa G. (2007). Detection of hepatitis A virus in mussels (Mytilus galloprovincialis) by RT-PCR and Nested-PCR. 2nd International Conference on Food and Nutrition. Poster Presentation. 24-26 October 2007, Istanbul.

Dagenais, L., Schwers, A., Pastoret, P. P., Chappuis, G. (1981). Propagation of bovine rotavirus by dogs. Veterinary Record: *Journal of the British Veterinary Association*, 109(9), 187.

Daniels, N. A., Bergmire-Sweat, D. A., Schwab, K. J., Hendricks, K. A., Reddy, S., Rowe, S. M., ve ark. (2000). A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of infectious diseases*, 181(4), 1467-1470.

Day, J., Spackman, E., Pantin-Jackwood, M. (2007). A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. *Avian diseases*, 51(3), 681-684.

Debas, H. T., Farooq, O., Grossman, M. I. (1975). Inhibition of gastric emptying is a physiological action of cholecystokinin. *Gastroenterology*, 68(5), 1211-1217.

Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gómara, M., Gray, J. (2009). Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British medical bulletin*, 90(1), 37-51.

Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus research*, 190, 75-96.

Desselberger, U. (2017). Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country:

likely causes and contributing factors. *Pathogens*, 6(4), 65

Dhama, K., Chauhan, R. S., Mahendran, M., & Malik, S. V. S. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. Veterinary research communications, 33(1), 1-23.

Doan, Y. H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O., Shulman, L. M. (2013). Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 182-189.

Dodet, B., Heseltine, E., Saliou, P. (1997). Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Trends in microbiology*, 5(5), 176-178.

Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Blixt, O., Paulson, J. C., Wagner, G., Harrison, S. C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *Journal of virology*, 76(20), 10512-10517.

Doro, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., Parashar, U., Bányai, K. (2014). Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure?. *Infection, genetics and evolution*, 28, 446-461.

Durmaz, R., Kalaycioglu, A. T., Acar, S., Bakkaloglu, Z., Karagoz, A., Korukluoglu, G., ve ark. (2014). Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PloS one*, 9(12).

Dutta, D., Chattopadhyay, S., Bagchi, P., Halder, U. C., Nandi, S., Mukherjee, A. ve ark. (2011). Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *Journal of Biological*

Dünya Sağlık Örgütü. (2008). Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. World Health Organization.

Dünya Sağlık Örgütü. (2009). Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009—conclusions and recommendations. Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire, 84(23), 220-236.

Dünya Sağlık Örgütü. (2016). Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013, 215 000. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/ Erişim : 06.09.2020

Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregear, G. W., & Holmes, I. H. (1986). Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3465-3468.

Ece, G., Samlioglu, P., Ulker, T., Kose, S., Ersan, G. (2012). Rotavirus and adenovirus prevalence at Tepecik education and research hospital (Turkey*). Le infezioni in medicina*, 20(2), 100-104.

Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A. S., Schraner, E. M., Fraefel, C., Wild, P., ve ark. (2012). Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PloS one*, 7(10), e47947.

El-Attar, L., Dhaliwal, W., Howard, C. R., Bridger, J. C. (2001). Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. *Virology*, 291(1), 172-182.

Erganiş O. *Veteriner Epidemiyoloji*. Konya: Mimoza Yayınları. 1993

Estes, M. K., Graham, D. Y., Smith, E. M., Gerba, C. P. (1979a). Rotavirus stability and inactivation. *Journal of General Virology*, 43(2), 403-409.

Estes, M. K., Graham, D. Y., Gerba, C. P., Smith, E. M. (1979b). Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *Journal of virology*, 31(3), 810-815.

Estes, M. K., Graham, D. Y., & Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *Journal of virology*, 39(3), 879-888.

Estes, M. K., ve Morris, A. P. (1999). A viral enterotoxin. In Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2 (pp. 73-82). *Springer*, Boston, MA.

Estes, M.K. (2001). Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strais, S.E. (Eds.), *Fields Virology*. 4th *ed*. Lipincott William and Wilkins, Philadelphia, Pa, pp. 1747−1785.

Estes MK, Kapikian AZ.(2007) Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. *5th* Edition ed.: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1917-1974.

Estes, M.K., Greenberg, H.B., (2013). Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., et al.(Eds.), *Fields Virology. , 6th ed.* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1347−1401.

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3), 2090.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.

Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology*, 80(2), 333-339.

Fenaux, M., Cuadras, M. A., Feng, N., Jaimes, M., Greenberg, H. B. (2006). Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *Journal of virology*, 80(11), 5219-5232.

Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J., Derrick, J. (1974). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *The Lancet*, 304(7872), 61-63.

Flores, J., Perez, I., White, L., Perez, M., Kalica, A. R., Marquina, R., ve ark. (1982). Genetic relatedness among human rotaviruses as determined by RNA hybridization. *Infection and Immunity*, 37(2), 648-655.

Franco, M. A., Angel, J., & Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(15), 2718-2731.

Fusco, G., Di Bartolo, I., Cioffi, B., Ianiro, G., Palermo, P., Monini, M., & Amoroso, M. G. (2017). Prevalence of foodborne viruses in mussels in Southern Italy. *Food and Environmental Virology*, 9(2), 187-194.

Fusco, G., Anastasio, A., Kingsley, D. H., Amoroso, M. G., Pepe, T., Fratamico, P. M., ve Boccia, F. (2019). Detection of hepatitis a virus and other enteric viruses in shellfish collected in the gulf of Naples, Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14), 2588.

Gallimore, C. I., Pipkin, C., Shrimpton, H., Green, A. D., Pickford, Y., McCartney, C. ve ark.. (2005). Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiology & Infection*, 133(1), 41-47.

Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A. M., Couturier, E., Carrillo-Santisteve, P., Pouey, J ve ark. (2011). Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerging infectious diseases*, 17(3), 566.

Gentsch, J. R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., ve ark. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(6), 1365-1373.

George V.G., Hierholzer J. C, Ades E.W. (1996) İçinde Mahy, B. W ve Kangro, H. O. (Editörler). *Virology methods manual*. Elsevier.

Ghalyoun F, Ünver Alçay A. (2018). Investigation of Rotavirus, Adenovirus and Astrovirus in mussels and shrimps using multiplex real-time PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (5): 761-767, 2018. DOI: 10.9775/kvfd.2018.19997

Ghosh, S. K., ve Naik, T. N. (1989). Detection of a large number of subgroup 1 human rotaviruses with a ―long‖ RNA electropherotype. *Archives of virology*, 105(1-2), 119-127.

Gladstone, B. P., Ramani, S., Mukhopadhya, I., Muliyil, J., Sarkar, R., Rehman, A. M., Desselberger, U. (2011). Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *N Engl J Med*, 365, 337-346.

Glass, R. I., 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. *Journal of Infectious Diseases*, 174(Supplement_1), S5-S11.

Gouvea, V., Santos, N., do C Timenetsky, M. (1994). Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1338-1340.

Gouvea, V. ve Brantly, M. (1995). Is rotavirus a population of reassortants?. *Trends in microbiology*, 3(4), 159-162.

Graham, D. Y., Sackman, J. W., Estes, M. K. (1984). Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea. *Digestive diseases and sciences*, 29(11), 1028-1035.

Grech, V., Calvagna, V., Falzon, A., Mifsud, A. (2001). Fatal, rotavirus-associated myocarditis and pneumonitis in a 2-year-old boy. *Annals of tropical paediatrics*, 21(2), 147-148.

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

Greenberg H.B. ve Estes MK (2013). Fields Virology, Chapter 45: Rotaviruses Sixth Edition edn: Lippincott Williams & Wilkins.

Griffin, M. R., Surowiec, J. J., Mccloskey, D. I., Capuano, B., Pierzynski, B., Quinn, M., ve ark (1982). Foodborne norwalk virus. *American Journal of Epidemiology*, 115(2), 178-184.

Gündeşlioğlu, Ö. Ö., Kocabaş, E., Haytoğlu, Z., Dayar, G. T., Çil, M. K., Durmaz, R. (2018). Adana İlinde Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Prevalansı ve Genotip Dağılımı. *Mikrobiyol Bul*, 52(2), 156-165.

Gülyaz V, Hasöksüz M, Özkul A, (2005). Türkiye'de yenidoğan ishalli buzağılarda ilk rotavirus izolasyonu. *Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 35, 3-6.

Haber, P., Parashar, U. D., Haber, M., DeStefano, F. (2015). Intussusception after monovalent rotavirus vaccine—United States, Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 2008–2014. *Vaccine*, 33(38), 4873-4877.

Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., ve ark. (2011). Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog*, 7(7), e1002115.

Hall, G., Kirk, M. D., Becker, N., Gregory, J. E., Unicomb, L., Millard, G ve ark. (2005). Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1257.

Hasöksüz M, Gülyaz V, Özdemir S, Apuhan ZP, (2008). Genotyping of bovine rotaviruses isolated from diarrheic calves feces in Turkey. XIV. International Congress of Virology, IUMS, s.341, İstanbul, Turkey.

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

Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M ve ark.. (2012). Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International journal of food microbiology*, 156(3), 231-238.

Hara, M., Mukoyama, J., Tsuruhara, T., Ashiwara, Y., Saito, Y., Tagaya, I. (1978). Acute gastroenteritis among schoolchildren associated with reovirus-like agent. *American journal of epidemiology*, 107(2), 161-169.

Hemida, M. G. (2013). Detection and molecular characterization of group D avian rota virus in Kafrelsheikh and Gharbia Governorates. *J. Vet. Sci*, 39, 145-154.

Hernandez, F., Monge, R., Jimenez, C., Taylor, L. (1997). Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (Latuca sativa) in Costa Rica. *International journal of food microbiology*, 37(2-3), 221-223.

Herwaldt, B. L., Lew, J. F., Moe, C. L., Lewis, D. C., Humphrey, C. D., Monroe, S. S. ve ark.(1994). Characterization of a variant strain of Norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 861-866.

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

Holland, R. E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*, *3*(4), 345-375.

Holloway, G., Johnson, R. I., Kang, Y., Dang, V. T., Stojanovski, D., Coulson, B. S. (2015). Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α-helix. *Journal of General Virology*, 96(12), 3519-3524.

Hoshino, Y., Wyatt, R. G., Scott, F. W., Appel, M. J. (1982). Isolation and characterization of a canine rotavirus. *Archives of virology*, 72(1-2), 113-125.

Hoshino, Y., & Kapikian, A. Z. (2000). Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 5-14.

Imagawa, H., Wada, R., Kamada, M., Komanomido, T., Fukunaga, Y., Hirasawa, K. (1984). Experimental infection of equine rotavirus in foals. *Bulletin of Equine Research Institute*, 1984(21), 65-71.

Jaykus, L. (2000). Enteric viruses as' emerging agents' of foodborne disease. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 245-255.

Joensuu, J., Koskenniemi, E., Pang, X. L., Vesikari, T. (1997). Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *The Lancet*, 350(9086), 1205-1209.

Jones, T. H. ve Muehlhauser, V. (2017). Frequency of hepatitis E virus, rotavirus and porcine enteric calicivirus at various stages of pork carcass processing in two pork processing plants. *International journal of food microbiology*, 259, 29-34.

Jonesteller, C. L., Burnett, E., Yen, C., Tate, J. E., Parashar, U. D. (2017). Effectiveness of rotavirus vaccination: a systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. *Clinical Infectious Diseases*, 65(5), 840-850.

Joshi, M. S., Jare, V. M., Gopalkrishna, V. (2017). Group C rotavirus infection in patients with acute gastroenteritis in outbreaks in western India between 2006 and 2014. *Epidemiology & Infection*, 145(2), 310-315.

Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., (1996). Rotaviruses. In: Fields, B.N., Knipe,D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology, 3rd* ed., vol 2. Lippincott- Raven Press, Philadelphia, Pa, pp. 1657–1708.

Kapikian, A. Z., Hoshino, Y., Chanock, R. M. (2001). *Fields virology*. Philadelphia, Lippincoot Williams & Wilkins.

Keidan, I., Shif, I., Keren, G., Passwell, J. H. (1992). Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous system involvement during rotavirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 11(9), 773-775.

Keller, R., Justino, J. F., Cassini, S. T. (2013). Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. *Journal of water and health*, 11(3), 573-580.

Kirkland, K. B., Meriwether, R. A., Leiss, J. K., Mac Kenzie, W. R. (1996). Steaming oysters does not prevent Norwalk-like gastroenteritis. *Public Health Report*s, 111(6), 527.

Kirkwood, C. D., Ma, L. F., Carey, M. E., Steele, A. D. (2019). The rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine*, 37(50), 7328-7335.

Kittigul, L., Panjangampatthana, A., Rupprom, K., Pombubpa, K. (2014). Genetic diversity of rotavirus strains circulating in environmental water and bivalve shellfish in Thailand. *International journal of environmental research and public health*, 11(2), 1299-1311.

Koçak, A. A., Aydın, M., Matsumoto, T., Yahiro, T., Dalgıç, B., Bozdayi, G., Ahmed, K. (2019). Emergence of rotavirus G9 in 2012, as the dominant genotype in Turkish children with diarrhea, in a university hospital in Ankara. *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 27(2), 209-218.

Kohl, O., Kožuch, O., Elečková, E., Labuda, M., Žaludko, J. (1996). Family outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Slovakia associated with a natural focus of infection. *European journal of epidemiology*, 12(4), 373-375.

Kool, D. A., Matsui, S. M., Greenberg, H. B., Holmes, I. H. (1992). Isolation and characterization of a novel reassortant between avian Ty-1 and simian RRV rotaviruses. *Journal of virology*, 66(11), 6836-6839.

Koopmans, M., Vinje, J., Duizer, E., de Wit, M., van Duijnhoven, Y. (2001, January). Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. In Novartis Foundation Symposium (pp. 197-218). Chichester; New York; John Wiley; 1999.

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

Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Ebina, T., Ishida, N. (1982a). Two distinct electrophoretic migration patterns of RNA segments of human rotaviruses prevalent in Japan in relation to their serotypes. *Microbiology and immunology*, 26(3), 271-273.

Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Kapikian, A. Z., Ebina, T., Ishida, N. (1982b). Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. *Journal of clinical microbiology*, 16(4), 727-730.

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children< 5 years of age: a systematic review. *PloS one*, 8(9), e72788.

Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H ve ark. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(39), 14040-14045.

Lawton, J. A., Estes, M. K., Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature structural biology*, 4(2), 118-121.

Le Guyader, F., Apaire-Marchais, V., Brillet, J., Billaudel, S. (1993). Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3963-3968.

Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., Pommepuy, M. (1994). Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3665-3671.

Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., & Pommepuy, M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. Applied and Environmental Microbiology, 66(8), 3241-3248.

Le Guyader, F. S., Le Saux, J. C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S. ve ark. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of clinical microbiology*, 46(12), 4011-4017.

Lo, S. V., Connolly, A. M., Palmer, S. R., Wright, D., Thomas, P. D., Joynson, D. (1994). The role of the pre-symptomatic food handler in a common source outbreak of food-borne SRSV gastroenteritis in a group of hospitals. *Epidemiology & Infection*, 113(3), 513-521.

Lopman, B. A., Pitzer, V. E., Sarkar, R., Gladstone, B., Patel, M., Glasser, J. ve ark. (2012). Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio-economic settings. *PloS one*, 7(8).

Lou, F., Neetoo, H., Li, J., Chen, H., Li, J. (2011). Inactivation of human rotavirus, vesicular stomatitis virus, and avian metapneumovirus by high-pressure processing: lack of correlation between barosensitivity of viruses and presence of viral envelope. *Applied and Environmental Microbiology*.

Lou, F., Neetoo, H., Chen, H., Li, J. (2015). High hydrostatic pressure processing: a promising nonthermal technology to inactivate viruses in high-risk foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 389-409.

Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I., Svensson, L. (2000). Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*, 287(5452), 491-495.

Lundgren, O., ve Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and infection*, 3(13), 1145-1156.

Lundgren, O., ve Svensson, L. (2003). I, 3. The enteric nervous system and infectious diarrhea. *In Perspectives in Medical Virology* (Vol. 9, pp. 51-67). Elsevier.

Lynch, M., Shieh, W. J., Tatti, K., Gentsch, J. R., Harris, T. F., Jiang, B., ve ark. (2003). The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. *Clinical infectious diseases*, 37(10), 1327-1333.

Lynch, M., Shieh, W. J., Bresee, J. S., Tatti, K. M., Gentsch, J. R., Jones, T. ve ark. (2006). Intussusception after administration of the rhesus tetravalent rotavirus vaccine (Rotashield): the search for a pathogenic mechanism. *Pediatrics*, 117(5), e827-e832.

Lynch, M. F., Tauxe, R. V., Hedberg, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology & Infection*, 137(3), 307-315.

Machnowska, P., Ellerbroek, L., Johne, R. (2014). Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Veterinary microbiology*, *168*(1), 60-68.

Madhi, S. A., Cunliffe, N. A., Steele, D., Witte, D., Kirsten, M., Louw, C., ve ark. (2016). Research Article (New England Journal of Medicine) Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *Malawi Medical Journal*, 28(3), 108-114.

Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 246-255.

Martinez, N., Espul, C., Cuello, H., Zhong, W., Jiang, X., Matson, D. O. (2002). Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995–1998. *Journal of medical virology*, 67(2), 289-298.

Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata, S., ve ark. (1989). An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *Journal of Infectious Diseases*, 160(4), 611-615.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., ve ark. (2008a). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of virology*, 82(7), 3204-3219.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M. K., ve ark. (2008b). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of virology*, 153(8), 1621-1629.

Matthijnssens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M ve ark. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future microbiology*, 4(10), 1303-1316.

Matthijnssens, J., Heylen, E., Zeller, M., Rahman, M., Lemey, P., Van Ranst, M. (2010). Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Molecular biology and evolution*, 27(10), 2431-2436.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R ve ark. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*, 156(8), 1397-1413

Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*, 157(6), 1177-1182.

Mayr, C., Strohe, G., Contzen, M. (2009). Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. *International journal of food microbiology*, 135(2), 179-182.

McDonald, S. M. ve Patton, J. T. (2011). Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology*, 19(3), 136-144.

McNulty, M. S., Allan, G. M., McFerran, J. B. (1977). Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. *Archives of virology*, 54(3), 201-209.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C. ve ark. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.

Mebus, C. A., Kono, M., Underdahl, N. R., Twiehaus, M. J. (1971). Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *The Canadian Veterinary Journal*, 12(3), 69.

Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A. ve ark. (2014). A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiology & Infection*, 142(1), 40-50.

Meral, M., Bozdayı, G., Özkan, S., Dalgıç, B., Alp, G., Ahmed, K. (2011). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus prevalansı, serotip ve elektroferotip dağılımı. *Mikrobiyol Bul*, 45(1), 104-12.

Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S. L., Fehér, E., Oldal, M., Bányai, K. E ark. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 660.

Mikami, T., Nakagomi, T., Tsutsui, R., Ishikawa, K., Onodera, Y., Arisawa, K., Nakagomi, O. (2004). An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. *Journal of medical virology*, 73(3), 460-464.

Moe, K., ve Shirley, J. A. (1982). The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of virology*, 72(3), 179-186.

Mori, Y., Sugiyama, M., Takayama, M., Atoji, Y., Masegi, T., Minamoto, N. (2001). Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model. *Virology*, 288(1), 63-70.

Mukhina, A. A., Shipulin, G. A., Bokovoĭ, A. G., Iatsyshina, S. B. (2002). Pilot experience of studying calicivirus infection in Moscow children. *Voprosy virusologii*, 47(6), 33.

Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F., Girones, R. (2003). Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *International journal of food microbiology*, 83(1), 75-85.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J., 1999. Reoviridae. In: F.A. Murphy, E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek and M.J. Studdert (eds), Veterinary Virology, Academic Press, USA, 391–404

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

Nakagomi, T., ve Nakagomi, O. S. A. M. U. (1989). RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *Journal of virology*, *63*(3), 1431-1434.

Nakagomi, T., ve Nakagomi, O. (2005). Rotavirus antigenemia in children with encephalopathy accompanied by rotavirus gastroenteritis. *Archives of virology*, 150(9), 1927-1931.

Nakagomi, T., ve Nakagomi, O. (2009). A critical review on a globally-licensed, live, orally-administrable, monovalent human rotavirus vaccine: Rotarix. Expert opinion on biological therapy, 9(8), 1073-1086.

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, S3-S15.

O'brien, J. A., Taylor, J. A., Bellamy, A. R. (2000). Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *Journal of virology*, 74(11), 5388-5394.

O ʻMahony, J., O ʻDonoghue, M., Morgan, J. G., Hill, C. (2000). Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimised plaque assay procedure. *International journal of food microbiology*, 61(2-3), 177-185.

OECD. (2012) ; Guidance Document For Demonstrating Efficacy of Pool and Spa Disinfectants in Laboratory and Field Testing ENV/JM/MONO(2012)15. http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)15&doclanguage=en Erişim : 11.01.2021

Osterhaus, A. D. M. E., Drost, G. A., Wirahadiredja, R. M. S., van den Ingh, T. S. (1980). Canine viral enteritis: Prevalence of parvo-, corona-and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Veterinary quarterly*, 2(4), 181-190.

Otto, P. H., Ahmed, M. U., Hotzel, H., Machnowska, P., Reetz, J., Roth, B. ve ark. (2012). Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Veterinary microbiology*, 156(1-2), 8-15.

Pager, C., Steele, D., Gwamanda, P., Driessen, M. (2000). A neonatal death associated with rotavirus infection--detection of rotavirus dsRNA in the cerebrospinal fluid. South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde, 90(4), 364.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., Griffin, P. M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998−2008. *Emerging infectious diseases*, 19(3), 407.

Palese, P. (1977). The genes of influenza virus. *Cell*, 10(1), 1-10.

Palese, P. (1993). Evolution of influenza and RNA viruses. *Emerging viruses*, 226-233.

Pang, X. L., Zeng, S. Q., Honma, S., Nakata, S , Vesikari, T. (2001). Effect of rotavirus vaccine on Sapporo virus gastroenteritis in Finnish infants. *The Pediatric infectious disease journal*, 20(3), 295-300.

Pang, X. L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J. K., & Yu Ip, C. C. (2004). Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. Journal of medical virology, 72(3), 496-501.

Pantin-Jackwood, M. J., Day, J. M., Jackwood, M. W., Spackman, E. (2008). Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian diseases*, 52(2), 235-244.

Papp, H., Matthijnssens, J., Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K. (2013). Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine*, 31(48), 5627-5633.

Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging infectious diseases,* 9(5), 565.

Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging infectious diseases*, 12(2), 304.

Parashar, U. D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., ve ark. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *The Journal of infectious diseases*, 200(Supplement_1), S9-S15.

Patel, M. M., Glass, R., Desai, R., Tate, J. E., Parashar, U. D. (2012). Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure?. *The Lancet Infectious Diseases,* 12(7), 561-570.

Patel, M. M., Pitzer, V., Alonso, W. J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J. ve ark. (2013). Global seasonality of rotavirus disease. *The Pediatric infectious disease journal*, *32*(4), e134.

Patterson, W., Haswell, P., Fryers, P. T., & Green, J. (1997). Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. Communicable disease report. CDR review, 7(7), R101.

Patton, J. T., Vasquez-Del Carpio, R., Tortorici, M. A., Taraporewala, Z. F. (2006). Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Advances in virus research*, 69, 167-201.

Pehlivan, E., Özen, G., Güneş, G., Karaoğlu, L., Türkol, E., Eğri, 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 in Foods of Animal Origin Traded at the Borders of Brazil, Argentina, and Uruguay. *Food and environmental virology*, 10(4), 365-372.

Phan, T. G., Okame, M., Nguyen, T. A., Maneekarn, N., Nishio, O., Okitsu, S., Ushijima, H. (2004). Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *Journal of medical virology*, 73(2), 256-261.

Ponka, A., Maunula, L., Von Bonsdorff, C. H., Lyytikäinen, O. (1999). An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiology and Infection*, 123(3), 469-474.

Rainsford, E. W., McCrae, M. A. (2007). Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus research*, 130(1-2), 193-201.

Ramani, S., Paul, A., Saravanabavan, A., Menon, V. K., Arumugam, R., Sowmyanarayanan, T. V., ve ark. (2010). Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections. *Clinical infectious diseases*, 51(11), 1284-1289.

Ramig, R. F. (1997). Genetics of the rotaviruses. *Annual review of microbiology*, 51(1), 225-255.

Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology*, 78(19), 10213-10220.

Ramsay, C. N., Upton, P. A. (1989). Hepatitis A and frozen raspberries. *Lancet* (London, England), 1(8628), 43.

Raphael , R. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S. (1985). Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(2), 124-128.

RCWG, Rotavirus Classification Working Group https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg Erişim tarihi: 27.10.2020

Reid, J. A., White, D. G., Caul, E. O., Palmer, S. R. (1988). Role of infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control. *The Lancet*, 332(8606), 321-323.

Resmi Gazete. (2011). Türk Gıda Kodeksi mikrobiyolojik kriterler yönetmeliği.

Reuter, G., Farkas, T., Berke, T., Jiang, X., Owen, M. D., & Szücs, G. (2002). Sapporo-like viruses in sporadic gastroenteritis of unknown origin. *Orvosi hetilap*, 143(7), 351.

Richards, G. P. (2001). Enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 117-125.

Robinson, S., Clarke, I. N., Vipond, I. B., Caul, E. O., Lambden, P. R. (2002).

Epidemiology of human sapporo-like caliciviruses in the South West of England:

Molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *Journal of medical virology*, 67(2), 282-288.

Rohwedder, A., Hotop, H., Minamoto, N., Ito, H., Nakagomi, O., Brüssow, H. (1997). Bovine rotavirus 993/83 shows a third subtype of avian VP7 protein. *Virus genes*, 14(2), 147-152.

Rosillon, D., Buyse, H., Friedland, L. R., Ng, S. P., Velázquez, F. R., Breuer, T. (2015). Risk of intussusception after rotavirus vaccination: meta-analysis of postlicensure studies. *The Pediatric infectious disease journal*, 34(7), 763-768.

Ruiz, M. C., Cohen, J., Michelangeli, F. (2000). Role of Ca2+ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell calcium*, 28(3), 137-149.

Ruiz-Palacios, G. M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., ... & Cervantes, Y. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 11-22.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA, 1980. Rotavirus-like calicivirus-like, and 23-nm virus like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol*, 12(1), 105-111.

Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., Chiba, S. (2001). Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *The Pediatric infectious disease journal*, 20(9), 849-853.

Salmi, T. T., Arstila, P., Koivikko, A. (1978). Central nervous system involvement in patients with rotavirus gastroenteritis. Scandinavian *Journal of Infectious Diseases*, 10(1), 29-31.

Santos, N., ve Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in medical virology*, 15(1), 29-56.

Sattar, S. A., Ijaz, M. K., Johnson-Lussenburg, C. M., Springthorpe, V. S. (1984). Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4), 879-881.

Sato, K., Inaba, Y., Shinozaki, T., Fujii, R., & Matumoto, M. (1981). Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Archives of virology*, 69(2), 155-160.

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. unspecified agents, 17, 16-22.

Serpen, A., (2009) Tokat, Erbaa'da Norovirus [Norwalk-Like Viruses (NLVs)] *Sal*gını ve Gıda Güvenliği, *Sağlık Dünyası Dergisi* Sayı: 5 .

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

Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of virology*, 78(14), 7763-7774.

Simonsen, L., Viboud, C., Elixhauser, A., Taylor, R. J., Kapikian, A. Z. (2005). More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *Journal of Infectious Diseases*, 192(Supplement_1), S36-S43.

Smulders, F., Nørrung, B., & Budka, H. (Eds.). (2013). Food borne viruses and prions and their significance for public health (Vol. 6). Wageningen Academic Publishers.

Steele, A.D., Geyer, A. and Gerdes, G.H., (2004). Rotavirus infections. İçinde: Coetzer, J.A.W. and Tustin, R.C. (editörler), *Infectious diseases of Livestock*, Oxford University Press, Southern Africa, 1256–1264.

Swain, P. ve Dhama, K., (1999). Calf diarrhea. *Indian Farming*, 48, 25–27

Şahan, S., Yılmaz, Ş., Topal, S., Özarslan, F., Çeliker Yenice, A., Cemil Göktaş, D., ve ark. (2017). Kahramanmaraş ili Elbistan ilçesinde görülen akut barsak enfeksiyonu vaka artışı incelemesi, Ağustos 2016. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 74(Supp: Su Kongresi), 13-20.

Tao, H., Changan, W., Zhaoying, F., Zinyi, C., Xuejian, C., Xiaoquang, L. ve ark. (1984). Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *The Lancet*, 323(8387), 1139-1142.

Tapisiz, A., Karahan, Z. C., Çiftçi, E., İnce, E., Doğru, Ü. (2011). Changing patterns of rotavirus genotypes in Turkey. *Current microbiology*, 63(6), 517.

Tapisiz, A., Bedir Demirdag, T., Cura Yayla, B. C., Gunes, C., Ugraş Dikmen, A., Tezer, H ve ark. (2019). Rotavirus infections in children in Turkey: A systematic review. *Reviews in medical virology*, 29(1), e2020.

Tate, J. E., ve Parashar, U. D. (2011). Monitoring impact and effectiveness of rotavirus vaccination. *Expert review of vaccines*, 10(8), 1123-1125.

Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 12(2), 136-141.

Tcheremenskaia, O., Marucci, G., De Petris, S., Ruggeri, F. M., Dovecar, D., Sternak, S. L., ve ark. (2007). Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *Journal of clinical microbiology*, 45(7), 2197-2204.

Theil KW (1990). Group A rotaviruses. İçinde Saif LJ, Theil KW, editörler. *Viral diarrhoea of man and animals*. West Palm Beach, FL: CRC Press; 35—72.

Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews microbiology*, 10(3), 165-177.

Tzipori, S., ve Makin, T. (1978). Propagation of human rotavirus in young dogs. *Veterinary Microbiology*, 3(1), 55-63.

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

Ushijima, H., Bosu, K., Abe, T., Shinozaki, T. (1986). Suspected rotavirus encephalitis. *Archives of disease in childhood*, 61(7), 692.

Uyar, Y., Çarhan, A., Özkaya, E., & Ertek, M. (2008). Türkiye'de 2008 Yılında Ortaya Çıkan İlk Norovirus Salgının Laboratuvar Souçlarının Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 42, 607-615.

Van der Heide, R., Koopmans, M. P. G., Shekary, N., Houwers, D. J., Van Duynhoven, Y. T. H. P., Van der Poel, W. H. M. (2005). Molecular characterizations of human and animal group a rotaviruses in the Netherlands. *Journal of clinical microbiology*, 43(2), 669-675.

Varghese, V., Das, S., Singh, N. B., Kojima, K., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Naik, T. N. (2003). Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Archives of virology*, 149(1), 155-172.

Vaughn, J. M., Chen, Y. S., Thomas, M. Z. (1986). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Applied and environmental microbiology*, 51(2), 391-394.

Vaughn, J. M., Chen, Y. S., Lindburg, K., Morales, D. (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2218-2221.

Velazquez, F. R., Matson, D. O., Calva, J. J., Guerrero, M. L., Morrow, A. L., Carter-Campbell, S., Ruiz-Palacios, G. M. (1996). Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *New England Journal of Medicine*, 335(14), 1022-1028.

Velazquez, D. E., Parashar, U. D., Jiang, B. (2014). Strain diversity plays no major role in the varying efficacy of rotavirus vaccines: an overview. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 561-571.

Vereta, L. A., Skorobrekha, V. Z., Nikolaeva, S. P., Aleksandrov, V. I., Tolstonogova, V. I., Zakharycheva, T. A., Savel'eva, N. A. (1991). The transmission of the tick-borne encephalitis virus via cow's milk. Meditsinskaia parazitologiia i parazitarnye bolezni, (3), 54-56.

Vesikari, T., Karvonen, A. V., Majuri, J., Zeng, S. Q., Pang, X. L., Kohberger, R., Kapikian, A. Z. (2006) A. Safety, efficacy, and immunogenicity of 2 doses of bovine-human (UK) and Rhesus–Rhesus-Human rotavirus reassortant tetravalent vaccines in Finnish children. *The Journal of infectious diseases*, 194(3), 370-376.

Vesikari, T., Clark, H. F., Offit, P. A., Dallas, M. J., DiStefano, D. J., Goveia, M. G., DiNubile, M. J. (2006) B. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine*, 24(22), 4821-4829.

Vesikari, T., Karvonen, A., Bouckenooghe, A., Suryakiran, P. V., Smolenov, I., Han, H. H. (2011). Immunogenicity, reactogenicity and safety of the human rotavirus vaccine RIX4414 oral suspension (liquid formulation) in Finnish infants. *Vaccine*, 29(11), 2079-2084.

Vesikari, T. (2012). Rotavirus vaccination: a concise review. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 57-63.

Vlasova, A. N., Deol, P., Sircar, S., Ghosh, S., Jakab, S., Bányai, K., Malik, Y. S. (2020). Animal Rotaviruses. In Animal-Origin Viral Zoonoses (pp. 163-202). Springer, Singapore.

Wang, H., Moon, S., Wang, Y., Jiang, B. (2012). Multiple virus infection alters rotavirus replication and expression of cytokines and Toll-like receptors in intestinal epithelial cells. *Virus research*, 167(1), 48-55.

Ward, R. L., McNeal, M. M., Steele, A. D. (2008). Why does the world need another rotavirus vaccine?. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(1), 49.

Wong, C. J., Price, Z., & Bruckner, D. A. (1984). Aseptic meningitis in an infant with rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 3(3), 244-245.

Yang, W. ve McCrae, M. A. (2012). The rotavirus enterotoxin (NSP4) promotes re-modeling of the intracellular microtubule network. *Virus research*, 163(1), 269-274.

Yilmaz, A., Bostan, K., Altan, E. D. A., 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. *Journal of food protection*, 74(5), 840-843.

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.

Yılmaz, H., Cizmecigil, U., Tarakçı, E. A., Aydın, Ö., Yılmaz, A., Çalıcıoğlu, M., ... & Turan, N. (2018). Investigation of Hepatitis A and E viruses in mussels collected from the bosphorus, in Istanbul, Turkey-Short communication.

Zaman, K., Anh, D. D., Victor, J. C., Shin, S., Yunus, M., Dallas, M. J., . Lewis, K. (2010). Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 376(9741), 615-623.

Zeller, M., Heylen, E., De Coster, S., Van Ranst, M., Matthijnssens, J. (2012). Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1492-1500.

Zhang, M., Zeng, C. Q. Y., Morris, A. P., Estes, M. K. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *Journal of Virology*, 74(24), 11663-11670.

ĠNTĠHAL RAPORU ĠLK SAYFASI

Çiğ VE tüketime HAZIR GIDA örneklerinde rotavirüsün MOLEKÜLER TANISI

ORIJINALLIK RAPORU

%6	%5	%3	%3
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
2	Carl D. Kirkwood, Lyou-Fu Ma, Megan E. Carey, A. Duncan Steele. "The rotavirus vaccine development pipeline", Vaccine, 2019 Yayın	<%1
3	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Desselberger, Ulrich. "Rotaviruses", Virus Research, 2014. Yayın	<%1
6	repositorio.ufpa.br İnternet Kaynağı	<%1
7	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1