

# Gıda Kaynaklı Virüsler <sup>1</sup>

**İbrahim ÇAKIR**

**Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü**

01. Genel Bilgiler
02. Gıda Örneklerinden Virüs İzolasyonu
  - 02.01. Virüs Ekstraksiyonu
  - 02.02. Hücre Kültürleri Üzerine İnokülasyon
03. Virüs Tanımlaması
04. Virüs Aranmasında Kullanılan Hızlı Yöntemler

## 01. Genel Bilgiler

Üzerinde buldukları gıdaların tüketilmesi sonucu vücuda girerek hastalıklara neden olan virüslerden bazıları; Hepatit A virüsü (HAV), Norwalk ve Norwalk benzeri virüsler, poliovirüsler, echovirüsler, astrovirüsler, calicivirüsler, enterik adenovirüsler, parvovirüsler ve rotavirüslerdir. Enterik virüsler intestinal sistemde çoğalabilmekte ve dışkı ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu vücuda girerek hastalığa neden olabilmektedir.

Viral kaynaklı gıda enfeksiyonlarından en yaygın olanları hepatit A (hepatit enfeksiyonu) ve akut gastroenteritistir. 1943 yılından bu yana 150 den fazla gıda kaynaklı hepatit A salgını meydana gelmiştir. Hepatit A, genellikle orta şiddette bir hastalık olup 15-50 gün inkübasyon süresinden sonra, ateş, halsizlik, bulantı, iştahsızlık, mide ve bağırsak sisteminde hafif ağrılar, deride ve özellikle göz akında meydana gelen sararmalar ve psikolojik depresyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Özellikle çocuklarda ve yaşlılarda belirtilerin uzun süre devam etmesi bazen ölümlere neden olabilmektedir.

Hepatit A virüsü (HAV), *Picornaviridae* familyasına ait olan enterovirüs grubunun 70 üyesinden birisidir. Bu virüsler asitlere karşı dayanıklı, tek iplikçikli RNA içeren ve 27 nm büyüklüğünde partiküllerdir. Başlangıçta gastrointestinal sistemde çoğalan HAV buradan karaciğere doğru yayılarak, hepatosit ve Kupffer hücrelerine bulaşmaktadır.

Gıda kaynaklı akut viral gastroenteritis belirtileri hepatit A ile benzer olup, ayrıca baş ağrısı ve nezle benzeri belirtiler de gösterebilmektedir. Hastalık belirtileri gıda tüketildikten 20 - 50 saat sonra ortaya çıkmakta ve 1 - 8 gün sonra sona ermektedir.

Özellikle çocuklarda ve yaşlılarda gastroenteritise neden olan bir diğer virüs grubu rotavirüslerdir. Grup A ve Grup B olmak üzere iki gruba ayrılmış olan rotavirüsler 70 nm partikül büyüklüğünde olup, çift iplikçikli RNA içermektedirler. Bunlardan Grup B 'ye dahil olan rotavirüsler gıdalarla olduğu kadar su ile de bulaşabilmektedir. B grubu rotavirüslerin neden olduğu enfeksiyonlardan birisi 1983 yılında Çin'de meydana gelmiş ve bu olayda 20000 'den fazla kişi su kaynaklı gastroenteritise yakalanmıştır.

---

<sup>1</sup> Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 31. Bölüm**

Gastroenteritise neden olan diğer virüsler, astrovirüsler, calicivirüsler ve enterik adenovirüslerdir. Astrovirüsler ve calicivirüsler genetik materyal olarak tek iplikçikli RNA içerirken, enterik adenovirüsler çift iplikçikli DNA içermektedirler ve partikül büyüklükleri sırasıyla; 28-30 nm, 30-38 nm ve 70-90 nm 'dir. Çok sık rastlanmamakla birlikte, echovirüs 4, poliovirüsler ve coxsackievirüsler de gıdalarla bulaşan viral hastalık sebepleri arasında gösterilmektedir.

Virüslerin taşınmasında aracı olan gıdalar arasında, midye ve diğer deniz ürünleri, içme suları, salatalar, dondurma, süt, ekmek ve diğer fırın ürünleri ile çiğ olarak tüketilen veya pişirildikten sonra elle işlem gören gıdalar bulunmaktadır. ABD 'nin New York eyaletinde 1982 yılından bu yana meydana gelen 100 ayrı salgın olayında 1017 kişide tüketmiş oldukları midye ve diğer deniz ürünleri nedeniyle gastroenteritis tespit edilmiştir.

## **02. Gıda Örneklerinden Virüs İzolasyonu**

Gıdalarda virüs aranması konusunda resmi olarak onaylanmış bir analiz yöntemi bulunmamaktadır. Her gıdanın yapısına bağlı olarak farklı uygulamalar söz konusu olmakla birlikte virüs aranması başlıca; örneklerden virüs ekstraksiyonu, hücre kültürlerine inokülasyon ve virüs tanımlaması aşamalarından oluşmaktadır.

### **02.01. Virüs Ekstraksiyonu**

Gıda örneklerinden virüs ekstraksiyonunda kullanılan yöntemleri iki yaklaşım altında toplamak mümkündür. Bunlardan birisi elusyon-presipitasyon yöntemi, diğeri ise adsorbsiyon-elusyon-presipitasyon yöntemidir.

Elusyon-presipitasyon yöntemin prensibi; gıda örneğini alkali pH da sıvılaştırdıktan sonra berraklaştırma işlemi ile çözülmeyen partikülleri uzaklaştırma ve süspansiyon fazını konsantre hale getirerek hücre kültürü üzerinde inoküle etmek esasına dayanmaktadır. Bu yöntem göre ; 100 g gıda örneği tartılır. 500 ml 0,09 M glisin-NaOH çözeltisi içinde (pH 8,8 - 9,5), 0 - 4 °C 'da 1-2 dakika süre ile homojenize edilir. % 0,1 - 0,5 berraklaştırma çözeltisi (Cat-Floc) ilave edilerek 20 dakika beklendikten sonra 9000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant steril bir kaba alınarak %3 - 6 oranında beef extract ilave edilir. Daha sonra yavaşça karıştırılarak 0,05 M glisin-HCl ( pH 1,5) çözeltisi ilave edilerek pH 3,5 - 4,5 ayarlanır ve 9000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geride kalan pelet üzerine 15 ml 0,15 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,0) çözeltisi ilave edilerek pH 7,2 - 7,4 'e ayarlanır. Karışıma antibiyotik ilave edildikten sonra hücre kültürü testine geçilir.

Çiğ olarak tüketilen meyve ve sebze örneklerinde virüs aranmasında modifiye elusyon-presipitasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu tür örneklerde homojenizasyon işlemine gerek kalmadan, sadece yüzeiden virüs izolasyonunun yapılması önerilmektedir. Bu yöntem göre ; 25 g gıda örneği alınır. Üzerine 100 ml 0,09 M glisin (pH 8,8) ve 2 ml % 1 Cat-Floc ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile 5 dakika karıştırılır. 15 dakika bekletildikten sonra vakum uygulanarak önce 11 cm Whatman GF/F filitresinden ardından 47 mm, 0,2 µm por çaplı filitreden geçirilir. Ultrafiltrasyon ile 20 kat konsantre edilen filtrat üzerine 0,1 hacim 10 x geliştirme besiyeri ilave edilerek hücre kültürü testine geçilir.

Adsorbsiyon-elusyon-presipitasyon yönteminin prensibi ise; gıda örneğinde bulunan virüslerin asit pH 'da sıvılaştırma aşamasında önce çözülmeyen gıda bileşenlerine adsorbe edilmesi, daha sonra berraklaştırma aşamasında virüslerin çözülmeyen bileşenlerden ayrılarak süspansiyon fazına geçirilmesi, sonra da konsantrite edilip hücre kültürü üzerine inoküle edilmesidir. Bu yöntemde göre ; 100 g gıda örneği alınarak, 700 ml destile su içinde 0 - 4 °C 'da 1-2 dakika homojenize edilir. pH 4,5 - 5,0 'e ayarlanır ve iletkenliğin <2 g/l NaCl olması sağlanarak 2000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 700 ml 0,09 M glisin, 0,14 M NaCl (pH 7,5-9,5) ile tekrar karıştırılıp 2000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Bu aşamada pelet atıldıktan sonra 1 N HCl ile pH 4,5 'e ayarlanır ve 15 dakika karıştırıldıktan sonra tekrar 2000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine 15 ml 0,15 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ilave edilir. 1 N HCl ile pH 7,2 - 7,5 'e ayarlandıktan sonra, %0,1 - 0,5 oranında berraklaştırma çözeltisi (Cat-Floc) ilave edilip 2000 g 'de 15 dakika santrifüj edilir. Pelet alınarak antibiyotik ilave edildikten sonra, virüs hücre kültürü testine geçilir.

Virüs ekstraksiyonu yapılırken, sıvılaştırma aşamasında örneğin ısınmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu aşama, işlem görmemiş gıda örneklerinde alternatif olarak örneğin öğütülmesi, mikserle parçalanması, steril bıçaklarla kesilerek yüzey alanının artırılması veya manyetik karıştırıcı ile karıştırılması şeklinde de yapılabilmektedir. Berraklaştırma aşamasında genellikle santrifüj veya kaba filtrasyon düzenekleri kullanılmaktadır. Ancak gıdanın karakterine ve içerdiği virüs miktarına bağlı olarak berraklaştırmanın etkinliğini arttırmak için polikasyon arıtma maddeleri (Cat-Flok; Calgon Corp.) kullanılması önerilmektedir.

Konsantrasyon aşamasının amacı örnek miktarını azaltarak olası virüs miktarını arttırmak, böylece daha sonraki hücre kültürü aşamasında kolaylık sağlamaktır. Konsantrasyon asit presipitasyonu veya organik flokulasyon yöntemleri ile yapılabilmektedir. Bu aşamada virüs partikülleri asit pH 'da çözülmüş gıda proteinlerine adsorbe olmakta (asit presipitasyonu) ya da ilave edilen beef ekstrakt veya yağsız süt tozu proteinlerine tutunmaktadır (organik flokulasyon). Ayrıca konsantrasyon amacıyla ultrasantrifüj veya ultrafiltrasyon sistemleri de kullanılabilir. Konsantrasyon işlemi dializ membranları ve polietilen glikol gibi hidrofilik polimerlerle de yapılabilmekte ancak, gerek zaman kaybı gerekse polietilen glikolün hücre kültürü üzerine toksik etkisinden dolayı pek tercih edilmemektedir.

Hücre kültürü uygulamadan önce son yapılması gereken mikrobiyel kontaminasyonların uzaklaştırılması işlemidir. Bunun için 0,2 - 0,45 µm por çapında membran filitreler kullanılabileceği gibi, yüksek düzeylerde antibiyotik, eter veya kloroform çözeltileri de kullanılabilir. Burada membran filitrelerin çok etkin olmalarına karşın bazen virüsleri adsorbe ettikleri ve böylece sayının azalmasına neden olabilecekleri unutulmamalıdır. Bu durum özellikle sayım yapılması gereken durumlarda önemli olup, mikrobiyel kontaminasyonların önlenmesinde antibiyotik kullanımı önerilmektedir.

## **02.02. Hücre Kültürleri Üzerine İnokülasyon**

Gıda örneklerinden elde edilen virüslerin çoğaltılmasında kullanılacak hücre kültürünün seçilmesi gıda örneğinin tipinden çok, aranan virüsün tipine bağlıdır. Kullanılan hücre kültürü birçok virüs çeşidinin gelişmesine uygun olmalı, gıdanın bileşiminde bulunan maddelerden toksikolojik olarak etkilenmemeli, kolay temin edilebilir olmalı ve laboratuvarında uygulanması kolay olmalıdır. Bu amaçlara en uygun olan hücre kültürleri insan embriyosu böbrek kültürü

ve Afrika yeşil maymunu veya rhesus maymunu böbrek kültürleridir. Bu iki hücre kültürü morfolojik ve biyokimyasal açıdan birbirine benzemekte olup, birçok enterovirüs türünün ve reovirüslerin çoğaltılmasına uygun olmakla birlikte, adenovirüsler ve coxsackievirüsler için iyi bir geliştirme ortamı değildirler. Bu hücre türlerine alternatif olarak, daha ucuz olan Buffalo yeşil maymun böbrek hücresi (BGM), rhesus maymunlarından alınarak oluşturulan MA-104 hücre kültürleri ve insan rhabdomysarkoma hücrelerinin bir hattı olan RD hücre kültürleri önerilmektedir.

Virüs ekstaktlarının hücre kültürlerine uygulanmasında iki yaklaşım vardır. Bunlardan birinci yaklaşıma göre var/yok şeklinde sonuç verilirken, ikinci yaklaşıma göre virüs sayısı belirlenebilmektedir. Birinci yaklaşımda enfekte olmuş hücre partikülü sayısı önemli değildir, ancak ikinci yaklaşımda dilüsyon yapılmakta ve sonuç TCID<sub>50</sub> değeri (%50 'den fazla sitopatik etki gözlenen doku kültürü enfeksiyon dozu) olarak verilmektedir. Sayım amacıyla kullanılabilen diğer yöntemler; en muhtemel sayı yöntemi, plak yöntemi ve radioimmunofocus assay yöntemleridir. Plak yöntemi ile enfeksiyona neden olan virüs sayısı belirlenebilmektedir ancak, deney koşulları örnekte bulunan bazı virüslerin diğerlerine karşı daha baskın olmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle daha çok birinci yaklaşım önerilmektedir.

Hücre kültürleri standart doku kültürü tekniklerine göre hazırlanmaktadır. Geliştirme ortamı olarak antibiyotik ilaveli minimal geliştirme besiyeri (Minimum Essential Medium; MEM) kullanılmaktadır.

Gıda ekstraktlarında bulunan virüslerin hücre kültürlerine adsorbe olmaları 37 °C 'da 1-2 saatte gerçekleşmektedir. Ekstraktın besiyeri üzerine yayılması elle yapılabileceği gibi, bu amaç için geliştirilmiş cihazlar da kullanılabilir. Hücre kültürü üzerine inoküle edilecek ekstrakt hacmi, adsorbsiyon periyodunun uzunluğuna göre değişmekte olup, tek katmanlı inokülasyonlar için en uygun olan adsorbsiyon hacmi 2 saatte  $\leq 0,02$  ml/cm<sup>2</sup> 'dir. Gıda ekstraktının konsantrasyonu aşaması adsorbsiyon periyodu ile birleştirilerek kullanıldığında, 1,4 ml/cm<sup>2</sup> inokülüm hacmi daha etkili sonuç vermektedir. Virüs izolasyonunda kullanılan hücre kültürünün yaşı da çok önemli bir etken olup, MEM üzerinde en fazla 5 - 10 gün sonra hücreler hızla değişime uğramaktadır. Virüslerin bir çoğu yeni hazırlanmış hücre kültürleri üzerinde gelişirken, bazı enterovirüslerin birkaç günlük hücre kültürleri üzerinde de rahatça geliştikleri bilinmektedir. Sonuç verilirken kullanılan hücre kültürünün yaşı mutlaka belirtilmelidir. Adsorbsiyon işleminden sonra, gerek var/yok testlerinde gerekse sayım yapılması gereken durumlarda % 0,75 agar ve % 0,0015 neutral red içeren MEM besiyeri ikinci bir tabaka olarak dökülmelidir.

Inoküle edilen kültürler sıvı besiyeri kullanılmış ise 2 günde bir örnek alınarak mikroskopta incelenir ve sitopatik etki görülen kültürler muhtemel virüs olarak kaydedilir. Tek tabaka ekimde 2-4 hafta inkübasyondan sonra % 75 veya daha fazla sitopatik etki görülen tüpler -70 °C 'da dondurulup sıvılaştırılarak düşük devirde santrifüj edildikten sonra, ikinci pasaj kontrol inokülasyonları yapılır.

Neutral red içeren katı besiyeri kullanıldığında petri kutuları ters çevrilmeden karanlık bir ortamda inkübe edilerek 2 hafta boyunca kontrol edilir ve sıvılaştırma görülen alanlar (plak) işaretlenir. Dört hafta inkübasyondan sonra plak oluşumu görülen ve görülmeyen (negatif kontrol) bölgelerden alınan örnekler -70 °C 'da dondurularak sıvılaştırıldıktan sonra tekrar inokülasyon yapılarak virüs varlığı kontrol edilir.

Gıdaların bileşiminde bulunan bazı maddelerin hücre kültürleri üzerine toksik etki yapmaları bazen yanlış negatif sonuçlar alınmasına neden olmaktadır. Bunu önlemek için kontamine olmamış ve ısı işlem uygulanmış gıda örnekleri kontrol amacıyla aynı şartlarda analiz edilmelidir. Toksik etki adsorbsiyon süresinin kısaltılması veya inokülüm miktarının azaltılması ile önlenmektedir.

### **03. Virüs Tanımlaması**

Hangi yöntemle izole edilmiş olursa olsun, virüs tanımlamasına geçmeden önce konsantrasyonunun yükseltilmesi gerekmektedir. Bunun için izolasyon aşamasında kullanılan hücre kültürleri üzerine tekrar inokülasyonları yapılarak yeterli yoğunluğa ulaşılabilmektedir. Virüs tanımlamasında gıda kaynaklı enfeksiyonun epidemiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri de dikkate alınarak, uygulanacak serolojik testlere karar verilmektedir. Bu özelliklerden bazıları gıdanın alınmasından sonra hastalığın ortaya çıkma süresi, tipik hastalık belirtileri, inkübasyon ve iyileşme süresidir.

Virüs tanımlamada kullanılan testlerden bazıları; nükleik asit tipi, virüsün şekli ve büyüklüğü, serolojik testler, eter ve asit duyarlılık testleridir. Nükleik asit belirleme testlerinde agaroz elektroforezi, şekil ve büyüklük testlerinde ise elektron mikroskobu kullanılmaktadır. Serolojik immunoassay testleri konakçının virüslere karşı oluşturduğu antikorların viral etkiyi inhibe etmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaca uygun olarak geliştirilmiş antiserumlar hazır kitler şeklinde temin edilebilmektedir. Klinik örneklerde virüs belirlemede kullanılan en eski yöntem immun elektron mikroskopi yöntemidir. Spesifik antiserumların geliştirilmesinden sonra bu yöntem gıda örneklerinde de kullanılmaya başlanmıştır.

### **04. Virüs Aranmasında Kullanılan Hızlı Yöntemler**

Virüs izolasyonunda ve özellikle tanımlanmasında hibridizasyon teknikleri ve PCR yöntemlerinin kullanılmaya başlaması ile analiz süresi birkaç haftadan birkaç güne kadar kısaltılmıştır. FDA/BAM AOAC tarafından deniz ürünlerinde HAV aranmasında ve sayımında PCR yöntemi standart analiz yöntemi olarak önerilmektedir. HAV hücre kültürleri üzerinde çok zor gelişmesi nedeniyle sitopatik etki veya plak oluşumunun tespit edilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Bu nedenle nükleik asit hibridizasyonu veya RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) teknikleri önerilmektedir. RT-PCR tekniğine göre virüs aranmasında *in vitro* olarak sentezlenmiş pHAV $\Delta$ 6 plazmidi kullanılmaktadır. Plazmidin saflaştırılmasında ve RNA'nın sentezlenmesinde Qiagen Plazmid Kit'i ve *EcoRI* kullanılmaktadır. PCR yöntemi ile genom sekans dizileri bilinen Norwalk virüslerinin de tespit edilmesi mümkündür. Bu amaç için geliştirilmiş olan spesifik hibridizasyon problemleri ve PCR primerleri mevcut olup ticari olarak temin edilebilmektedir.

Tanımlamada kullanılan diğer bazı yöntemler; floresan boyalarla (immunofloresanassay), radyoaktif maddelerle (radioimmunoassay ve (radiofocusimmunoassay) ve enzimlerle (immunoenzymatic assay) işaretlenmiş antikorların kullanıldığı serolojik testlerdir. Bu testler daha çok klinik izolatlardan için geliştirilmiş olmakla birlikte, birkaç kez çoğaltma işleminden sonra gıda örneklerinden izole edilen virüslerin tanımlanmasında da başarı ile kullanılabilmektedir.