

## Samsun ve çevresinde atık su ve kanalizasyon çıkışlarında yetişen midyelerde Hepatitis A virüsü prevalansı

Gökhan İNAT<sup>1</sup>, Ahmet KOLUMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kurupelit, Samsun

<sup>2</sup> Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 23.12.2013

**Özet:** Hepatitis A Virüsü (HAV) kontamine su, taze ürünler ve su ürünlerinden kaynaklanan akut hepatit ile seyreden bir enfeksiyona neden olmaktadır. Avrupa Birliği (AB) ve diğer sosyal refahı yüksek, temiz suya ulaşımı kolayca sağlayan, gelişmiş ülkelerde seropozitiflik oranı %5-10 seviyesinde bildirilmektedir. Buna karşılık refah seviyesi ve sosyo ekonomik güç düştükçe seropozitiflik oranının %95'e kadar çıktığı bildirilmektedir. Midye ve diğer filtrasyonla beslenen su ürünleri HAV kontaminasyonu yönünden önemli bir kaynak olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2012 tarihleri arasında; Samsun ili merkezi ile Alaçam, Engiz, 19 Mayıs ve Canik ilçelerinde, özellikle bölge arıtma ve lağım sularının denize döküldüğü bölgeler seçilerek toplanan 60 adet midye materyal olarak kullanıldı. Midyelerin her biri steril poşetlere konularak soğuk zincir altında laboratuara gönderildi ve laboratuara geldiği gün içerisinde analiz edildi. Analiz amacıyla öncelikle numunenin hazırlanması takiben proses kontrol virusu (Mengo Virus) ile kontaminasyon, elüsyon, konsantrasyon, RNA ekstraksiyonu, viral RNA'nın Real Time PCR ile tespiti ve sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması gerçekleştirilmiştir. Analiz işlemlerinin her bir aşamasında farklı yazarlar tarafından bildirilen yöntemler kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre toplam 60 midye örneğinin 5 tanesinde (%8,33) HAV kontaminasyonu saptanmıştır. Örneklerin alındığı bölgelere göre HAV dağılımı şu şekildedir; Merkez ve Alaçam'dan alınan 12 örneğin 2'sinde (%16,66) ve Canik ilçesinden alınan 12 örneğin 1'inde (%8,33) tespit edilmiştir. Endüstriyel ve evsel atıklardan kaynaklanan çevre ve kıyı kirlenmesi doğrudan insan sağlığını tehdit etmektedir. Aynı zamanda midye gibi deniz kabuklularının tüketimine bağlı olarak insanlarda HAV enfeksiyonları gelişebilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Hepatitis A virüsü, Mengo Virüs, Midye, Real Time PZR.

### The prevalence of Hepatitis A virus in mussels rearing live in outfalls of wastewater and sewers in Samsun province

**Summary:** Virus Hepatitis A (HAV) is widespread in contaminated water, fresh products and water products and cause an infection prosecuting with acute hepatitis. It is announced that seropositivity is 5-10% in European Union (EU) and other socially high affluent, easily reaching clean water, developed countries. However, it is declared that as affluence level and socio-economic power decrease seropositivity increases up to 95%. It is noted that mussel and other water products feed by filtration are important source for HAV contamination. In this study over the period February-March 2012, 60 mussels are used as a material collected from places where district refining and underground sewer flow into the sea in Samsun, Alaçam, Engiz, 19 Mayıs and Canik. Mussels were transferred to laboratory in sterilized bags under cold chain and analysed in the same day. For the purpose of analysis, contamination with process control virus (Virus Mengo), elusion, concentration, RNA extraction, viral RNA detection with Real Time PCR and assesment of results and interpretation are done. Methods noted by different authors are used in the steps of the analysis. According to the results of the study, 5 mussels (8,33%) are found to be contaminated with HAV. HAV distribution according to the regions where samples are collected is as follows; 2 (16,66%) of 12 samples from Centrum and Alaçam and 1 (8,33%) of 12 samples from Canik are identified. Enviromental and coastal contamination caused by industrial and domestic waste impends human health directly. Also, there could be an infection on people depending on the accumulation on water products taking nourishment by filtration such as mussel, after mussel consumption.

**Key words:** Mussel, Real Time PCR, Virus Hepatitis A, Virus Mengo.

## Giriş

Hepatit A Virüsü (HAV) Picornaviridea ailesi, Hepatovirüs genusu içinde yer alır. HAV, bu genusun tek üyesidir. Hepatit A'nın tanımlanan en az 20 genotipi olmasına rağmen, sadece bir serotipi vardır. Tanımlanan 20 kadar suştan dördü (I, II, III, VII) insanlarda hastalık yapabilmektedir. Hepatitis A Virüsü (HAV) kontamine su, taze ürünler ve su ürünlerinden kaynaklanan akut hepatit ile seyreden bir enfeksiyona neden olmaktadır [8].

Her ne kadar birincil bulaş yolu insandan insana olsa da özellikle gelişmekte olan ülkelerde kanalizasyon sistemlerinin yeterince düzenli olmaması ve su temininin uygun şekilde yapılamaması; besinler ve su yolu ile bulaşmayı ön plana çıkarmaktadır. Kontamine su, pişmemiş yiyecekler veya piştikten sonra temas edilen yiyecekler kontaminasyon kaynağıdır [17]. Çiğ ya da az pişmiş kabuklu deniz ürünlerinin tüketimi enfeksiyon geçişinde önemli bir yoldur. Avrupa Birliği (AB) ve diğer sosyal refahı yüksek, temiz suya ulaşımı kolayca sağlayan, gelişmiş ülkelerde seropozitiflik oranı %5-10 seviyesinde bildirilmektedir. Buna karşılık refah seviyesi ve sosyo ekonomik güç düştükçe seropozitiflik oranının %95'e kadar çıktığı bildirilmektedir. Midye ve diğer filtrasyonla beslenen su ürünleri HAV kontaminasyonu yönünden önemli bir kaynak olarak bildirilmektedir [12, 10].

Bu çalışma ile Samsun merkez ve çevre ilçelerde özellikle atık su ve kanalizasyon çıkışlarında yetişen ve toplanan, ve bölgede oldukça yaygın olarak tüketilen midyelerde HAV tespiti, yaygınlığı ve dağılımının moleküler analizler ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2012 tarihleri arasında; Samsun ili merkezi ile Alaçam, Engiz, 19 Mayıs ve Canik ilçelerinde, özellikle bölge arıtma ve lağım sularının denize döküldüğü bölgeler seçilerek toplanan 60 adet midye materyal olarak kullanıldı. Midyelerin her biri steril poşetlere konularak soğuk zincir altında laboratuara gönderildi ve laboratuara geldiği gün içerisinde analiz edildi.

Analiz amacıyla öncelikle numunenin hazırlanmasını takiben proses kontrol virusu (Mengo Virus) ile kontaminasyon, elüsyon, konsantrasyon, RNA ekstraksiyonu, viral RNA'nın Real Time PCR

ile tespiti, sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması gerçekleştirildi. Farklı aşamalardan oluşan analiz işlemlerinin her bir aşamasında farklı yazarlar tarafından bildirilen yöntemler kullanıldı [7,16,14].

**Numune Hazırlama:** Analize alınmaya uygun şekilde gelen numuneler HAV analizi için hazırlandı. Aseptik koşullarda mevcut numuneyi temsil edecek şekilde 25 gr numune tartılarak steril petri kaplarına alındı.

**Kontrol Virusunu ile numunenin kontaminasyonu:** Ceeram mengo@ceeramTools kitinin kullanma talimatına göre numune kontrol virusu ile kontamine edildi. Bu amaçla uygun miktarlarda kontrol virusu kullanılır. İlgili kitin kullanma talimatında stok virusun 3 kez den fazla dondurulup çözülmemesi tavsiye edildiğinden stok virus 2 numune için 20 µl olacak şekilde 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine taksim edilerek -80°C' ye kaldırıldı. Bir numune için 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpündeki 10 µl kontrol virusunun üzerine 90 µl steril ultrapure su eklenerek vortekste homojenize edildikten sonra kısa süreli santrifüj edildi. Laminar flow kabinde steril petride bulunan numunenin üzerine 10-100 µl'lik otomatik pipet kullanılarak damlalar halinde verildi ve kurumaya bırakıldı.(yaklaşık 1.5-2 saat) Daha sonra midye 250 ml'lik bir behere steril pens kullanılarak alındı ve buzdolabına kaldırılarak 1 gece buzdolabında bırakıldı (tam kurumanın sağlanması ve stabilizasyon için).

**Elüsyon:** Bir gece buzdolabında beklemiş PKV ile kontamine edilen numune buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığında 20 dakika bırakıldı. Bunun üzerine laminar kabin içinde oda ısısına getirilmiş Glisin-saline tamponundan 75 ml mezürle ölçülerek eklendi ve 5 dk bu şekilde bırakıldı. Daha sonra 100-1000 µl'lik otomatik pipet ve steril bir pens kullanılarak her midyenin iki yüzü de yukarıdan aşağıya zikzak yapılarak 20 şer kez olmak kaydı ile beher içinde bulunan tampon ile yıkandı. Yıkanan midye petri kabına alınarak diğerleri ile karışması engellendi. Bütün midye tampon ile yıkandıktan sonra beherdeki elüsyon tamponu 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne eşit miktarda aktararak soğutmalı santrifüjde +4°C'de 10000Xg de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde süpernatant dikkatli bir şekilde 100 ml'lik bir behere alınarak pH'sı 7.2±0.5 e ayarlandı (Numunenin pH sına göre bu işlem 1N HCl veya 1N NaOH ile yapılır).



Şekil 1. Samsun ili siyasi haritası.

**Konsantrasyon:** Bu işlem için PEG 6000 (Polyethylen Glycol) kullanıldı. Bir önceki aşamada pH'sı  $7,2 \pm 0,5$  e ayarlanmış olan süpernatantın içerisine son konsantrasyon %10 PEG 6000+0,3M NaCl olacak şekilde (60 ml süpernatant için 6 gr PEG + 1.1 gr NaCl) daha önceden tartılmış kimyasal maddeler ve steril manyetik balık eklendi. PEG eriyinceye kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda bırakıldı (yaklaşık 15 dakika). Daha sonra  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de manyetik karıştırıcıda orta hızda 4 saat bırakıldı. Bu sürenin sonunda 50 ml'lik santrifüj tüplerine eşit miktarda paylaştırılan karışım  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de  $10000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant dikkatli bir şekilde kendine ait behere aktarıldı ancak tüpün dibinde bir miktar kalması sağlandı. Bu kalan süpernatant ile 100-1000  $\mu\text{l}$ 'lik otomatik pipet kullanılarak pelet homojenize edildi ve "konsantre homojenizat" olarak adlandırıldı. Bu konsantre homojenizat 1.5 ml'lik 2 mikrosantrifüj tüpüne alındı (Her mikrosantrifüj tüpünde yaklaşık 1 ml olacak şekilde).



Şekil 2. Analiz için hazırlanan Midye örnekleri.

**Ekstraksiyon:** Viral nükleik asidin ekstraksiyonu 2 aşamada gerçekleştirildi.

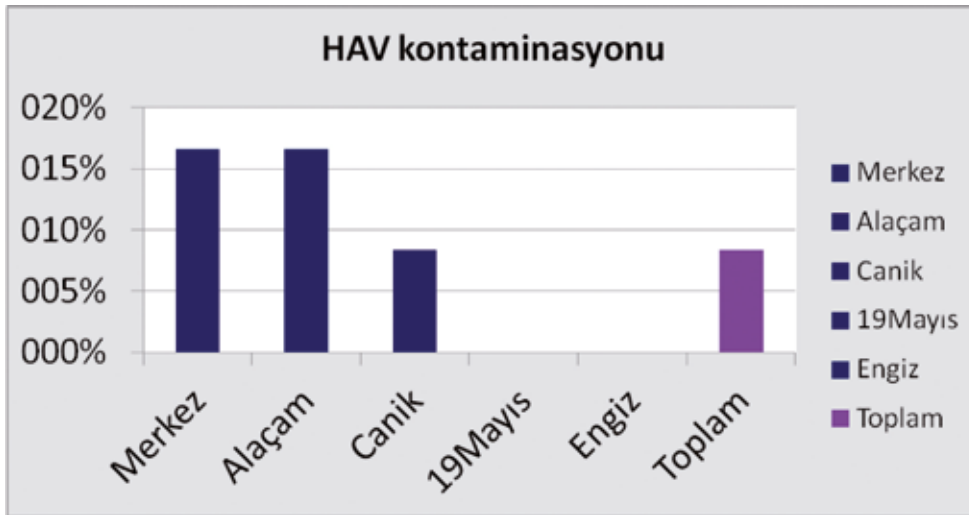
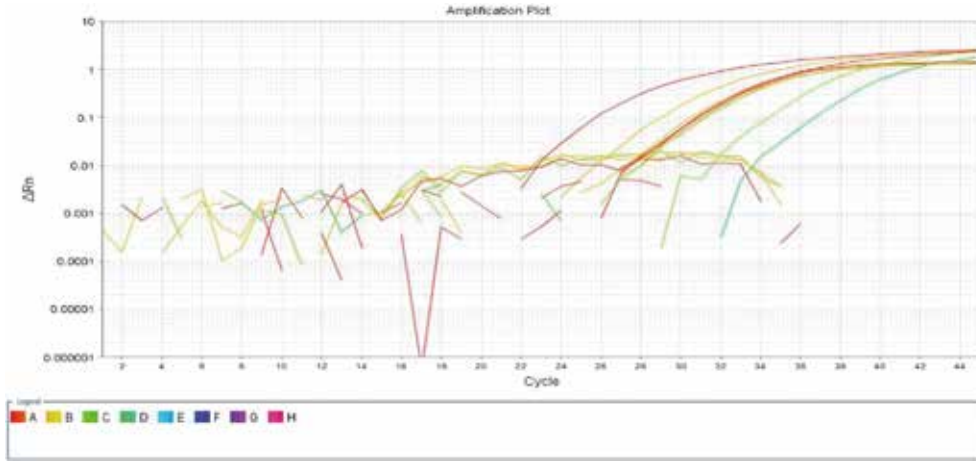
1. Lizis ve faz ayırımının yapılması
2. RNA'nın kolona bağlanması, yıkama ve RNA elüsyonu

**Viral RNA'nın tespiti:** Bu amaçla Real Time PCR (RT-PCR) kullanıldı. Hem numunede bulunup bulunmadığı araştırılan HAV için hem de PKV olarak kullanılan Mengovirus için 2 ayrı kit kullanılarak aynı pleytte iki reaksiyon beraber yürütüldü. Bu reaksiyonlar için mastermix hazırlanmadan önce ABI 7500 Real Time PCR cihazının reaksiyonlar için özgül ayarları yapılarak zaman kaybı önlenmiş olur. Bunun için cihaz ve cihaza bağlı bilgisayar açıldıktan sonra aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	
	1 kez	1 kez	45 döngü	
<b>Zaman</b>	10 dakika	10 dakika	15 saniye	45 saniye
<b>Isı</b>	$45^{\circ}\text{C}$	$95^{\circ}\text{C}$	$95^{\circ}\text{C}$	$60^{\circ}\text{C}$

HEDEF	HAV	IPC	SONUÇ
<b>Floresan</b>	FAM-MGB	VIC-TAMRA	
	+	+/-	Hepatitis A pozitif
	-	+	Hepatitis A negatif
	-	-	Ekstraksiyon tekrar edilir veya numune RNA'sı 1/10 dilüe edildikten sonra reaksiyon tekrarlanır

## Bulgular



Çalışmanın sonuçlarına göre toplam 60 midye örneğinin 5 tanesinde (%8,33) HAV kontaminasyonu saptanmıştır. Örneklerin alındığı bölgelere göre HAV dağılımı şu şekildedir; Merkez ve Alaçam'dan alınan 12'şer örneğin 2'sinde (%16,66) ve Canik ilçesinden alınan 12 örneğin 1'inde (%8,33) HAV tespit edilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Kabuklu deniz ürünleri ile bağlantılı viral hastalıklara neden olan patojenlerin tespiti halk sağlığı için potansiyel tehlikeyi belirlemede birincil öneme sahiptir. Kabuklu deniz ürünleri özellikle de midyelerde viral RNA tespiti için yapılan analizlerde çeşitli yöntemlerin kullanımı daha önce rapor edilmiştir [11,1,5,18]. Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki,

midyelerde viral patojenlerin tespiti için en başarılı yol PCR analizleridir. Bununla birlikte midyelerden HAV tespitinde RT-PCR kullanımının analizlerde duyarlılığın artmasına neden olduğu ve düşük yoğunluktaki viral patojenlerin tespitini kolaylaştırdığı bildirilmiştir [7,13,20].

Çalışmamızda 60 midye örneğinde viral RNA'nın RT-PCR ile tespiti yapılmış ve (%8,3)'lük bir prevalans saptanmıştır. Tablo 1'de, seçilmiş bölgelerde yapılan çalışmalarda pozitif HAV oranında farklı sonuçlar ortaya çıktığı görülmektedir. Bu çalışma bulguları, söz konusu bölgeden toplanan midye örneklerindeki HAV kontaminasyonunun düşük düzeylerde olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, Karadeniz bölgesinin nispeten daha az nüfus yoğunluğuna sahip olması ve dolayısıyla deniz kirliliğinin daha az olması ile ilişkilendirilebilir. Lee

ve arkadaşlarının (1999), kirliliği bilinen ve nüfus yoğunluğu fazla olan bir bölgede yaptıkları çalışmada buldukları %5,5'lik oran, numunelerin büyük

kısımının marketlerden toplanması ve duyarlılığı düşük yöntemlerin kullanılması bu düşük pozitifliği açıklayabilir.

**Tablo 1.** Bazı Seçilmiş Bölgelerde yapılan çalışmalarda PCR ile Analize Alınan Deniz Kabukluları ve Midyelerde Pozitif HAV Dağılımı.

Lokalizasyon	Örnek sayısı	Örnek	Metot	Pozitif HAV	Kaynak
Güney İtalya	180	Midye	RT-PCR	67 (%37.2)	[6]
İtalya	118	Deniz kabuklusu	RT-PCR	17 (%14.4)	[21]
İtalya, Yunanistan ve İspanya	290	Midye	RT-PCR	53 (%18.2)	[3]
Hong Kong	150	Midye	PCR	(%5.5)	[9]
Portekiz	2000	Deniz kabuklusu	PCR	%33	[15]
İspanya	164	Midye ve istiridye	RT-PCR	%27.4	[19]
Amerika	31	Deniz kabuklusu	RT-PCR	18 (%58)	[4]
Fransa	108	Deniz kabuklusu	RT-PCR	%13	[12]
İspanya	81	Midye	RT-PCR	%18.5	[2]

Sonuç olarak, mevcut moleküler teknikler çevre ve gıda kaynaklı HAV tespitinde yeterli gibi görülse de daha ucuz ve standart yöntemlerin geliştirilmesi ile kabuklu deniz ürünleri ve özellikle de midyelerde kantitatif viral hepatit tespiti daha da kolaylaşacaktır. Endüstriyel ve evsel atıklardan kaynaklanan çevre ve kıyı kirlenmesi doğrudan insan sağlığını tehdit etmektedir. Aynı zamanda, midye gibi filtrasyonla beslenen canlılarda birikime bağlı olarak HAV, yeterince ısı işlemi görmemiş midye tüketimi sonrasında enfeksiyonu tetikleyebilmektedir. Kabuklu deniz ürünlerinin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilme alışkanlığı hastalık riskini arttırmaktadır. Pişirme süresi (1 dk.) ve sıcaklığına (merkezde +85°C) azami dikkat virüsün inaktivasyonunda önemli bir rol almaktadır. Son olarak moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile bu çalışma bölgelerindeki midyelerden izole edilen suşlar ile insanlarda hastalık oluşturan HAV suşları arasında ki ilişkiyi ortaya koymak son derece önemlidir.

## Kaynaklar

- Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK, (1995). *Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR*. Appl Environ Microbiol. 61, 3014-3018.
- Carmen FM, Jesús LR, (2013). *Detection and Characterization of Hepatitis A Virus and Norovirus in Mussels from Galicia (NW Spain)*. Food Environ Virology. 5, 110-118.
- Chironna M, Germinario C, De Medici D, Fiore A, Di Pasquale S, Quarto M, Barbuti S, (2002). *Detection of Hepatitis A Virus in Mussels from Different Sources Marketed in Puglia Region ( South Italy)*. Int J Food Microbiol. 75, 11-18
- Chung H, Jaykus LA, Sobsey MD, (1996). *Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro ampli®-cation of nucleic acids*. Appl Environ Microbiol. 62, 3772-3778.
- Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L, (1999). *Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested-reverse transcription-PCR*. Int J Food Microbiol. 48, 67-71.
- Croci L, De Medici D, Ciccozzi M, Di Pasquale S, Suffredini E, Toti L, (2003). *Contamination of Mussels by Hepatitis A Virus: A Public-Health Problem in Southern Italy*. Food Control. 14, 559-563.
- De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L, (2001). *Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR*. Lett Appl Microbiol. 33, 362-366.
- Koopmans M, Duizer E, (2004). *Foodborne viruses: an emerging problem*. Int J Food Microbiol. 90, 23-41.
- Lee T, Yam WC, Tam TY, Ho BSW, Ng MH, Brown WG, (1999). *Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (Perna viridis)*. Water Res. 33, 885-889.
- Lees D, (2000). *Viruses and bivalve shellfish*. Int J Food Microbiol. 59, 81-116.
- 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 transcriptionsemimed PCR*. Appl Environ Microbiol. 60, 3665-3671.

12. Le Guyader F, Miossec L, Haugarreau L, Dubois E, Kopecka H, Pommepuy M, (1998). *RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period*. *Water Sci Technol*. 38, 45-50.
13. Le Guyader F, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, Atmar RL, (2009). *Detection and quantification of noroviruses in shellfish*. *Appl Environ Microbiol*. 75, 618-624.
14. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS, (2005). *Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish*. *J Virol Methods*, 123, 1-7.
15. Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, Castilho F, Santos R, Monteiro S, (2011). *Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal*. *Food Microbiol*. 28, 936-941.
16. Muniain-Mujika I, Calvo M, Licena F, Girones R, (2003). *Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish*. *Int J Food Microbiol*. 83, 75-85.
17. Omana VN, Guoliang X, Gilberto V, Harold SM, (2006). *Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach*. *Clin Microbiol Rev*. 19, 63-79.
18. Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A, (2009). *Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A*. *Appl Environ Microbiol*. 75, 7350-7355.
19. Romalde JL, Area E, Sánchez G, Ribao C, Torrado I, Abad X, (2002). *Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): Inadequacy of the EU standards of microbiological quality*. *Int J Food Microbiol* 74, 119-130.
20. Shieh YC, Khudyakov YE, Xia G, Ganova-Raeva LM, Woods JW, Veazey JE, Motes ML, Glatzer MB, Bialek SR, Fiore AE, (2007). *Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak*. *J Food Prot*. 70,145-150.
21. Terio V, Di Pinto A, Di Pinto B, Martella V, Tantillo G, (2010). *RNA Extraction Method for the PCR detection of hepatitis A Virus in Shellfish*. *Int J Food Microbiol*. 142, 198-201.