

## Su örneklerinde norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR ile belirlenmesi

### Determination of norovirus in water samples by cross-flow microfiltration and RT-PCR

Pınar KAYNAR<sup>1</sup>, Mustafa YILMAZ<sup>1</sup>, Özgül SEMİZOĞLU<sup>1</sup>, Zehra İrem ERİŞ<sup>1</sup>, Fatma KARADENİZ-DURSUN<sup>1</sup>, Yıldırım CESARETLİ<sup>1</sup>, Mustafa Kemal BAŞARALI<sup>2</sup>, İrfan ŞENCAN<sup>3</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Ülkemizde halk sağlığını tehdit eden gastroenterit salgınlarının kontrol altına alınması ve salgın kaynağının tespit edilmesine yönelik su örneklerinden norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile belirlenmesi için kullanılacak yöntemin uygulanabilirliğinin sağlanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çeşitli hacimlerdeki su örnekleri içerisine belirlenmiş farklı miktarlardaki Mengo kontrol virüsü ( $4,21 \times 10^5$  copy/ $\mu$ L) ile klinik örneklerden izole edilmiş Norovirüs GII izolatları eklenmiştir. Bu su örnekleri, 10-30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak cross-flow mikrofiltrasyon ile filtrasyon işlemi ve filtrasyon işlemi sonrası santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst sıvı kısımdan QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Crawley - UK) üreticisinin talimatları doğrultusunda uygulanarak viral RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen viral RNA'nın amplifikasyon işlemi ise RT-PCR kit (Ceeram, Fransa) kullanılarak RT-PCR ile yapılmıştır.

**Bulgular:** Su örneklerine eklenen Mengo kontrol virüsü ve Norovirüs GII izolatları sırasıyla filtrasyon, santrifügasyon, viral RNA izolasyonu ve amplifikasyonu işlemi uygulanmıştır. Çalışmamızda, virüs miktarındaki

#### ABSTRACT

**Objective:** It is aimed to detect of the method to be applied for norovirus in water samples by RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) and cross-flow microfiltration to determine the origin of epidemic and to control gastroenteritis epidemics that are a threat to public health in our country.

**Methods:** Different amounts of Mengo control virus ( $4.21 \times 10^5$  copy/ $\mu$ L) and Norovirus GII isolates from clinical samples were added to various volumes of water samples. These water samples were first filtrated with cross-flow filtration using 10-30 kD nominal molecular weighed filter cassettes and then centrifuged. After centrifugation, viral RNA isolation was performed from the supernatant layer according to the instructions of QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen Crawley - UK) producer. Amplification of isolated viral RNA was performed with RT-PCR by using RT-PCR kit (Ceeram, France).

**Results:** Filtration, centrifugation, viral RNA isolation and amplification were applied respectively to the water samples which Mengo control virus and Norovirus GII isolates were added. In our study, it was

<sup>1</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici Güvenliği Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, ANKARA

<sup>2</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcılığı, ANKARA

<sup>3</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ANKARA

**İletişim / Corresponding Author :** Pınar KAYNAR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tük. Güv. Lab. ve Biyo. Ür. Dai. Bşk., Adnan Saygun Cad. No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara  
Tel : +90 312 565 51 52 E-posta / E-mail : pinar.kaynar@saglik.gov.tr

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2017.67699

Kaynar P, Yılmaz M, Semizoğlu Ö, Eriş ZE, Karadeniz-Dursun F, Cesaretli Y, Başaralı MK, Şencan İ. Su örneklerinde norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR ile belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2017; 74(EK-1): 1-6

geri kazanım oranının %20-25 arasında olduğu görülmüştür. Virüs miktarındaki geri kazanımın düşük olmasının sebebinin filtrasyon işleminin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda; virüs kayıplarını minimize etmek için filtrasyon işlemi sonrası santrifüj işleminin uygulanmasının gerekliliği ortaya çıkarmıştır. 10 veya 30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak filtrasyon işleminin yapılmasının virüs miktarındaki geri kazanıma etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır.

**Sonuç:** Su örneklerinde norovirüs varlığının RT-PCR ile belirlenmesinde, filtrasyon aşamasının önemli bir yer tuttuğu görülmüştür. Virüs kaybının önlenmesi için büyük su hacimlere gereksinim duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** su, norovirüs, filtrasyon, RT-PCR

seen that recovery ratio of virus amount is among 20-25% range. It is seen that the main reason of poor recovery is the filtration process. This study showed us that it is necessary to apply centrifugation after filtration to minimize virus loss. Using 10 or 30 kD nominal weighed filter cassettes for filtration made no effect to virus recovery.

**Conclusion:** It is seen that filtration is an important step in detection of norovirus in water samples with RT-PCR. Large volumes of water samples are needed to avoid virus loss.

**Key Words:** water, norovirus, filtration, RT-PCR

## GİRİŞ

Dünya genelinde toplum sağlığını tehdit eden gastroenterit salgın etkenlerinin başında akut viral etkenler gelmektedir. Viral etkenler, primer olarak kontamine su veya gıdalar ile insanlara bulaşmakta ve tüm yaş gruplarını etkilemektedir (1-3). Ülkemizde, 2008 yılına kadar “salgın şeklinde” norovirüs enfeksiyon bildirimi yapılmadığı görülmektedir (4). 2009-2012 yılları arasında ülkemizde görülen salgınlarda, klinik örneklerden izole edilen etkenlerin dağılımında norovirüslerin %48 ile birinci sırada yer aldığı görülmektedir (5). Söz konusu salgınların önlenmesi için etkenin yanında kaynağının da belirlenmesi önemli bir yer tutmaktadır. Farklı ülkelerde görülen su kaynaklı salgın durumlarında, su örneklerinde norovirüs etkeninin belirlenmesi için filtrasyon işlemi ve RT-PCR ile çalışmalar yapıldığı görülmektedir (6-8). Bu nedenle ülkemizde, halk sağlığını tehdit eden gastroenterit salgınlarının kontrol altına alınması ve salgın kaynağının tespit edilmesine yönelik su örneklerinden norovirüs varlığının cross-

flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR ile belirlenmesi için kullanılacak yöntemin uygulanabilirliğinin sağlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Su örneklerinde norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon kullanılarak RT-PCR ile belirlenmesi amacıyla yöntemin uygulanabilirliğini göstermek için yürütülen yöntemsel çalışmamız; Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun Tüketici Güvenciliği Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığının Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında ve 01.01.2015-31.10.2016 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda; toplam 70 adet çeşitli hacimlerdeki saf su örnekleri içerisine (5L, 10L, 15L, 20L, 25L, 50L, 75L ve 100L) belirlenmiş farklı miktarlardaki Mengo kontrol virüsü ( $4,21 \times 10^5$  copy/ $\mu$ L) eklenmiş ve 10-30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak cross-flow mikrofiltrasyon (Sartorius) ile filtrasyon işlemi yapılmıştır (9) (Şekil 1).



Şekil 1. Su örneklerinde filtrasyon işlemi için kullanılan cross-flow mikrofiltrasyon cihazının görünümü

Filtrasyon işlemi sonrası elde edilen filtrat, 6000 rpm'de 5 dak. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst sıvı kısım, genom RNA ekstraksiyonu için 4°C'de muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen üst sıvı kısımdan QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK) üreticisinin talimatları doğrultusunda uygulanarak viral RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen viral RNA'nın amplifikasyon işlemi, RT-PCR kit (Ceeram, Fransa) kullanılarak RT-PCR ile yapılmıştır (10). RT-PCR amplifikasyon programı; toplam 40 döngü olacak şekilde programlanarak her döngü; 45 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C'de 45 saniye şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Norovirüs GII'ye ait standart (Quantification Standard, Ceeram-Fransa) ile üreticinin talimatlarına göre 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> kopya içeren paralel dilusyonlar hazırlanmış ve dört noktalı bir standart eğrisi oluşturulmuştur.

Çalışmamızda; klinik örneklerden izole edilmiş Norovirüs GII izolatları da saf su örnekleri içerisine eklenmiş ve aynı işlem basamakları uygulanmıştır. Filtrasyon ve santrifüj işlemi sırasında hedef virüs kaybının kontrolü için bu su örneklerin içerisine Mengo kontrol virüsü eklenmiştir.

### BULGULAR

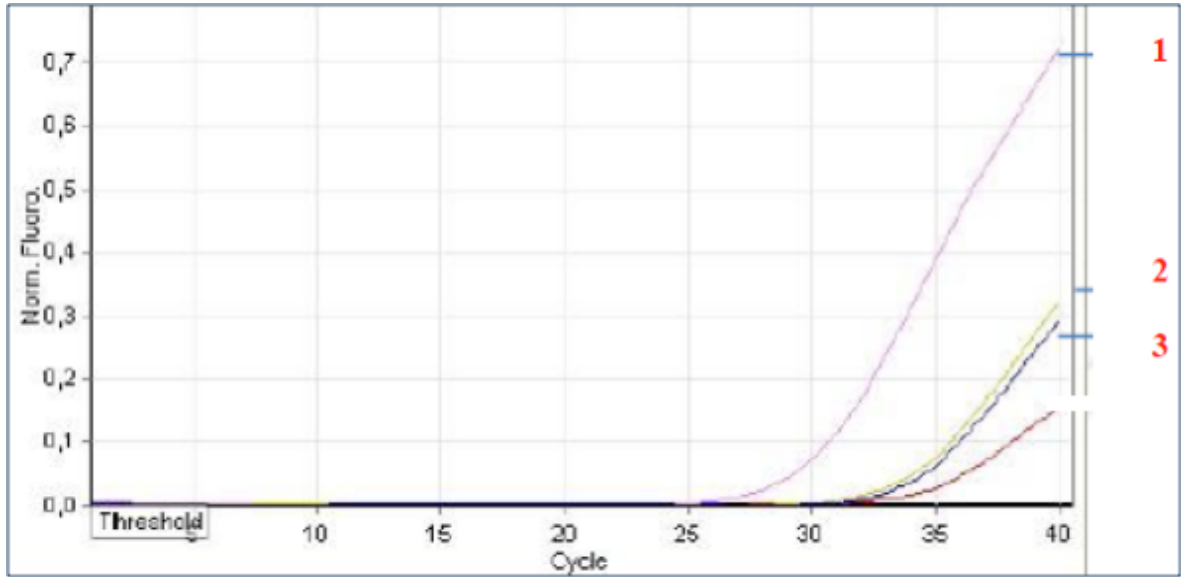
Su örneklerinde norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon kullanılarak RT-PCR ile belirlenmesi

yönteminin uygulanabilirliğini göstermek için yapılan çalışmamızda; saf su örneklerine eklenen Mengo kontrol virüsü ve Norovirüs GII izolatları sırasıyla filtrasyon, santrifügasyon ve RT-PCR işlemleri yapılmıştır. Çalışmamızda, virüs miktarındaki geri kazanım oranının %20-25 arasında olduğu görülmüştür. Virüs miktarındaki geri kazanımın düşük olmasının sebebinin filtrasyon işleminin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda; virüs kayıplarını minimize etmek için filtrasyon işlemi sonrası santrifüj işleminin uygulanmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. 10 veya 30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak filtrasyon işleminin yapılmasının virüs miktarındaki geri kazanıma etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 2).

Çalışmamızda, viral RNA izolasyonu ve amplifikasyonunu çevresel örnekler ait kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genom RNA ekstraksiyonu ve viral RNA amplifikasyonu için kullanılan çevresel örneklere yönelik kitlerin kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Su örneklerinden elde edilen sonuçlar Şekil 3'de verilmiştir. Su örneklerinden norovirüslerin belirlenmesi çalışmalarında mutlaka Mengo kontrol virüsü kullanılarak çalışmanın yapılması ve sistemin kontrol edilmesi gerekmektedir.

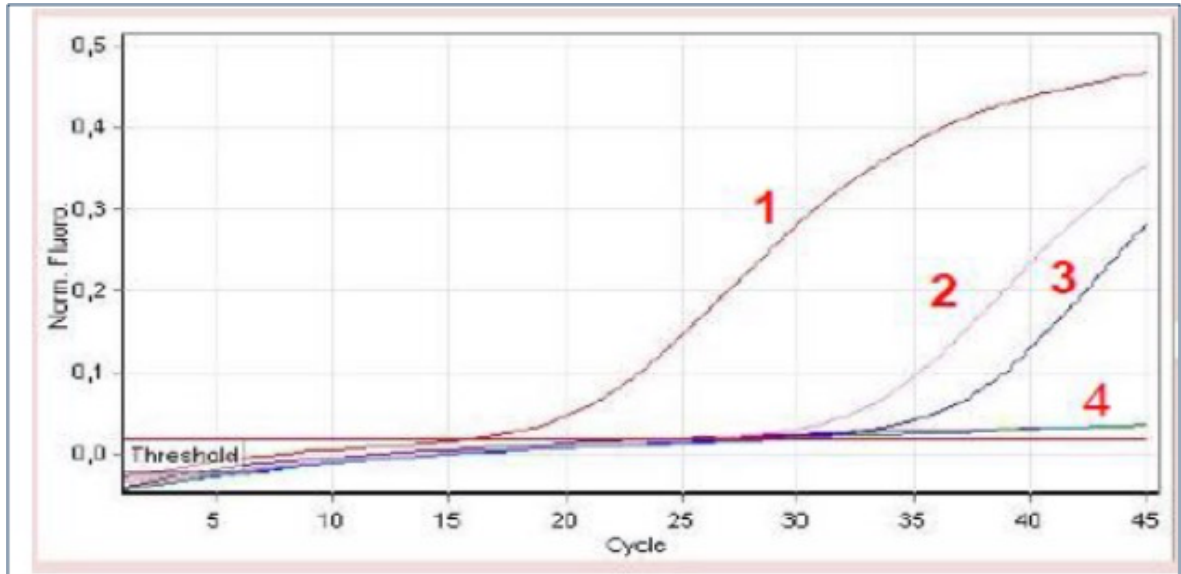
### TARTIŞMA

Ülkemizde, halk sağlığını tehdit eden gastroenterit salgınlarının kontrol altına alınması ve salgın kaynağının tespit edilmesi amacıyla su örneklerinden norovirüs varlığının belirlenmesine yönelik yöntemsel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Günümüzde de çeşitli ülkeler kullandıkları suları, RT-PCR ile norovirüs tespitine yönelik çalışmalarına devam etmektedir (11-13). Çalışmamızda; su örneklerinden norovirüs varlığının RT-PCR ile belirlenmesinde filtrasyon aşamasının önemli bir yer tuttuğu ortaya çıkmıştır. Virüs miktarındaki geri kazanımın düşük olmasının sebebinin filtrasyon işleminin olduğu görülmüştür. Virüs kayıplarını minimize etmek için filtrasyon



1. Norovirüs örneği
2. 10 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kaset kullanımı
3. 30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kaset kullanımı

Şekil 2. Su örneklerinin 10 - 30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak filtrasyon işlemlerin sonuçlarının RT-PCR'daki görünümü



1. Mengovirüs
2. Filtrasyon ve santrifüj sonrası mengovirüs
3. Filtrasyon sonrası mengovirüs
4. 10 L su örneğindeki mengovirüsü

Şekil 2. Su örneklerinden elde edilen sonuçların RT-PCR'daki görünümü

işlemi sonrası santrifüj işleminin uygulanmasının gerekliliği belirlenmiştir. Ramírez-Castillo ve ark., (14); moleküler tekniklerin zorlukları olarak su konsantrasyon yöntemlerine (virüs için ultrafiltrasyon ve direkt flokülasyon protokolleri, su konsantrasyon yöntemleri olarak kullanıldığını) ve su örneklerindeki inhibitörlerin varlığının olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda; 10 veya 30 kD'luk nominal moleküler ağırlıklı filtre kasetler kullanılarak filtrasyon işleminin yapılmasının virüs miktarındaki geri kazanıma etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır (Şekil 2). Su örneklerinden norovirüslerin belirlenmesine yönelik farklı filtrasyon yöntemleri kullanılmaktadır (15-16). Su örneklerinde özellikle düşük miktardaki norovirüs içeren su örneklerinden norovirüs varlığının RT-PCR ile belirlenmesinde; virüs kayıplarının önlenmesi amacıyla farklı filtrasyon

işlemlerinin uygulanması ileriki çalışmalarımızın konusu olarak düşünülmektedir. Ayrıca virüs kaybının önlenmesi için büyük su hacimlerine ihtiyaç duyulmakta ve bir odak noktasından en az 100L su numunesi ihtiyaç duyulmaktadır (17). Çalışmamız sonucunda; viral salgın durumları için kısa zaman aralığı içerisinde salgının kaynağının belirlenmesinde büyük hacimdeki su örneklerinin laboratuvara ulaştırılması ve filtrasyon işleminin uygulanmasının en zor aşamaları olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, halk sağlığını tehdit eden gastroenterit salgınlarının kontrol altına alınması ve salgın kaynağının tespit edilmesine yönelik su örneklerinden norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR ile belirlenmesi için kullanılacak yöntemin uygulanabilirliği sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Anonymous. Gastroenteritler. T.C. Sağlık Bakanlığı, THSK, Bulaşıcı Hastalıkları Daire Başkanlığı. [http://thsk.gov.tr/tr/index.php/su-ve-besinlerle-bulasan-hastaliklar/369-gastroenterit\\_ishal](http://thsk.gov.tr/tr/index.php/su-ve-besinlerle-bulasan-hastaliklar/369-gastroenterit_ishal), (Erişim Tarihi: 03.02.2014).
2. Reynolds K, Mena K, Gerba C. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2008; 192: 117-58.
3. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII. 4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, 2009; 200 (5): 802-12.
4. Korukoğlu G, Çağlayık-Yağcı D. Viral gastroenteritlerin laboratuvar tanısı. [www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2013/01/20.01.2013-GÜLAY-KORUKOĞLU-dic.pdf](http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2013/01/20.01.2013-GÜLAY-KORUKOĞLU-dic.pdf), (Erişim Tarihi: 26.11.2013).
5. Kireççi E, Özer A. Norovirüsler, salgınları ve mücadele. *Van Tıp Derg*, 2011;18 (1): 49-56.
6. Yap J, Qadir A, Liu I, Loh J, Tan BH, Lee VJ. Outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a military facility in Singapore: a public health perspective. *Singapore Med J*, 2012; 53 (4): 249-54.
7. Xue C, Fu Y, Zhu W, Fei Y, Zhu L, Zhang H, et al. An outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a boarding school in Shanghai: a retrospective cohort study. *BMC Public Health*, 2014; 14: 1092.
8. Kauppinen A, Al-Hello H, Zacheus O, Kilponen J, Maunula L, Huusko S, et al. Increase in outbreaks of gastroenteritis linked to bathing water in Finland in summer 2014. *Euro Surveill*, 2017; 22 (8): 1-8.
9. Pasco E. Virus concentration by crossflow membrane filtration: effect of hydrodynamic conditions and membrane properties. Doctoral Dissertation, Michigan State University, 2012.
10. Laverick MA, Wyn-Jones AP, Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39: 127-36.

11. Tong HI, Connell C, Boehm AB, Lu Y. Effective detection of human noroviruses in Hawaiian waters using enhanced RT-PCR methods. *Water Res*, 2011; 45 (18): 5837-48.
12. Zhou X, Li H, Sun L, Mo Y, Chen S, Wu X, et al. Epidemiological and molecular analysis of a waterborne outbreak of norovirus GII.4. *Epidemiol Infect*, 2012; 140 (12): 2282-9.
13. Gregory JB, Webster LF, Griffith JF, Stewart JR. Improved detection and quantitation of norovirus from water. *J Virol Methods*, 2011; 172 (1-2): 38-45.
14. Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, et al. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, 2015; 4 (2): 307-34.
15. Tian P, Yang D, Pan L, Mandrella R. Application of a receptor-binding capture quantitative reverse transcription-PCR assay to concentrate human norovirus from sewage and to study the distribution and stability of the virus. *Appl Environ Microbiol*, 2012; 78 (2): 429-36.
16. Francy DS, Stelzer EA, Brady AMG, Huitger C, Bushon RN, Ip HS, et al. Comparison of filters for concentrating microbial indicators and pathogens in lake water samples. *Appl Environ Microbiol*, 2013; 79 (4): 1342-52.
17. Lodder WJ, van den Berg HHJL, Rutjes SA, de Roda Husman AM. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*, 2010; 76 (17): 5965-71.