

# Mersin İli Kan Donörlerinde Flavivirus Seroepidemiolojisi

## Flavivirus Seroepidemiology in Blood Donors in Mersin Province, Turkey

Seda TEZCAN<sup>1</sup>, Serpil KIZILDAMAR<sup>1</sup>, Mahmut ÜLGER<sup>2</sup>, Gönül ASLAN<sup>1</sup>, Naci TİFTİK<sup>3</sup>,  
Aykut ÖZKUL<sup>4</sup>, Gürol EMEKDAŞ<sup>1</sup>, Matthias NIEDRIG<sup>5</sup>, Koray ERGÜNAY<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>1</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>2</sup> Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

<sup>3</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Mersin.

<sup>3</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Hematology, Mersin, Turkey.

<sup>4</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>4</sup> Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara, Turkey.

<sup>5</sup> Robert Koch Enstitüsü, Biyolojik Tehditler ve Özel Patojenler Merkezi, Berlin, Almanya.

<sup>5</sup> Robert Koch Institute, Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Berlin, Germany.

<sup>6</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Ünitesi, Ankara.

<sup>6</sup> Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Virology Unit, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.09.2014

### ÖZET

Çeşitli arthropod vektörler ile bulaşan flaviviruslar arasında Batı Nil virusu (West Nile virus, WNV), kene kaynaklı ensefalit virusu (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) ve Deng virusu (Dengue Virus, DENV), tüm dünyada endemik bölgelerde en yaygın olarak izlenen ve önemli halk sağlığı sorunu oluşturan etkenlerdir. Bu seroepidemiyolojik çalışmada, flavivirus aktivitesi konusunda sınırlı veri bulunan Mersin ilinde sağlıklı kan donörlerinde DENV, WNV ve TBEV antikorları, çeşitli serolojik testlerle değerlendirilmiştir. Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kan Merkezine Ağustos 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında kabul edilen, toplam 920 kan donöründen (tümü erkek; yaş aralığı: 18-63 yıl, yaş ortalaması:  $35.17 \pm 9.56$  yıl) alınan serum örnekleri, bilgilendirilmiş onam sonrası çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm örnekler DENV IgG ve IgM açısından ticari bir ELISA yöntemiyle taranmış; pozitif örnekler indirekt immüno Floresans (IIFT) yöntemiyle sarı humma virusu (Yellow Fever virus, YFV) IgG, TBEV IgG ve IgM ve ELISA ile WNV IgG yönünden test edilmiştir. Tüm pozitif örnekler ayrıca WNV plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) uygulanmıştır. TBEV pozitif örnekler de PRNT yöntemiyle antikor özgüllüğü yönünden değerlendirilmiştir. DENV IgM pozitif örnekler, DENV NS1 antijeni ve IgM/

**İletişim (Correspondence):** Yrd. Doç. Dr. Seda Tezcan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, Yenişehir 33343, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 361 0684-1153, **E-posta (E-mail):** tezcanseda@yahoo.com

IgG antikorları yönünden ticari bir immünokromatografik yöntemle çalışılmıştır. İncelenen örneklerin %0.9 (8/920)'unda DENV IgM, %16.6 (153/920)'sında ise DENV IgG seropozitifliği tespit edilmiştir. Bir örnekte eşzamanlı IgM ve IgG pozitifliği izlenmiştir. Reaktif örneklerin %85.6 (137/160)'sında PRNT ile WNV nötralizan antikorlarının varlığı saptanmıştır. Örneklerin %0.43 (4/920)'ünde DENV IgM pozitif veya sınırda pozitif olarak bulunmuş; ancak tüm örnekler NS1 antijeni ve alternatif antikor testinde negatif sonuç vermiştir. WNV PRNT negatif olan ve DENV ve TBEV IgG IIFT'de pozitif olan iki örnekte TBEV PRNT ile negatif sonuç alınmıştır. WNV ve TBEV PRNT testleriyle negatif bulunan toplam 19 örneğin 7 (%30.4)'sinde DENV IgG sınırda pozitif, 6 (%26.1)'sında DENV IgG pozitif, 6 (%26.1)'sında ise DENV IgG pozitifliği ile diğer çeşitli flaviviruslara karşı pozitiflik izlenmiştir. Sınırdaki pozitif olarak saptanan örnekler değerlendirme dışında bırakıldığında, toplam 12 örneğin (12/920, %1.3), DENV veya antijenik olarak benzerliğe sahip flaviviruslara maruziyeti temsil ettiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgular, çalışma grubunda flaviviruslara karşı izlenen seroreaktivitenin en önemli nedeninin, %14.9 (137/920) oranında saptanan WNV enfeksiyonlarına bağlı olduğunu göstermektedir. İncelenen örneklerin %2.5 (23/920)'inde ise WNV ve TBEV dışı flavivirusların dolaşımına işaret eden ilk epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. WNV, bölgede izlenen nedeni bilinmeyen ateşli hastalık veya nöroinvazif viral enfeksiyonlarda ayırıcı tanıda dikkate alınmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** *Dengue virus; West Nile virus; flavivirus; seroprevalans; epidemiyoloji.*

## ABSTRACT

Among the vector-borne flaviviruses, West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Dengue virus (DENV) constitute the most frequently-observed pathogens with significant public health impact in endemic regions throughout the globe. This seroepidemiological study was undertaken to investigate human exposure to DENV, WNV and TBEV, as well as other flaviviruses via various serological assays in the Mediterranean province of Mersin, Turkey, where scarce data is currently present for the circulation of these agent. A total of 920 sera were collected after informed consent from asymptomatic blood donors (all were male; age range: 18-63 yrs, mean age: 35.17 ± 9.56 yrs) were taken between August 2010 and April 2011. All samples were initially screened via a commercial ELISA kit for DENV IgM and IgG. Reactive samples were further evaluated via commercial indirect immunofluorescence tests (IIFTs) for yellow fever virus (YFV) IgG, TBEV IgG and via ELISA for WNV IgG. Moreover, presence of neutralizing antibodies were investigated in all reactive samples via plaque reduction neutralization (PRNT) assay for WNV, whose activity has been detected previously in the region. Samples interpreted as positive for TBEV IgG were further evaluated for specificity by TBEV PRNT assay. DENV IgM reactive samples were also assessed for NS1 antigens and IgM/IgG antibodies via a commercial immunochromatographic assay (ICA). DENV IgM and IgG antibodies were detected in 0.9% (8/920) and 16.6% (153/920) of the samples, respectively. One sample was simultaneously positive for IgM and IgG. WNV PRNT revealed positive results in 85.6% (137/160) of the reactive samples, which indicated frequent WNV exposure and frequent development of cross-reactions in the screening assay. Positive or borderline DENV IgM reactivity was identified in 0.43% (4/920) of the samples, which remained negative for NS1 antigen and antibodies in the ICA. Antibody specificity in two samples, positive for DENV and TBEV IgG in IIFT could not be confirmed by TBEV PRNT. A total of 19 reactive samples (19/920, 2.1%), that comprise seven borderline and six positive DENV IgG positivities as well as six samples with IgG positivity for different virus combinations remained negative after DENV confirmatory and WNV/TBEV PRNT assays. When the samples with borderline results were omitted from the evaluation, 12 samples (12/920, 1.3%) were considered to represent exposure to DENV or an antigenically-similar flavivirus. These findings indicated the activity of and frequent exposure (137/920, 14.9%) to WNV, as previously suggested in the study region. In 1.3% of the samples, probable exposure to DENV or other flaviviruses was revealed and this requires further serosurveillance efforts. WNV must be considered in the etiology of febrile diseases or viral neuroinvasive infections of unexplained etiology in the study area.

**Key words:** *Dengue virus; West Nile virus; flavivirus; seroprevalence; epidemiology.*

## GİRİŞ

Vektör kaynaklı ya da artropod kaynaklı enfeksiyonlar, çeşitli faktörler nedeniyle değişen yaygınlıkları ve oluşturabildikleri ciddi klinik tablolar nedeniyle, dünya çapında önemli halk sağlığı sorunu olarak izlenmektedir<sup>1</sup>. Viruslar tarafından oluşturulan artropod kaynaklı enfeksiyonlar (arbovirus enfeksiyonları) arasında önemli bir grubu flaviviruslar oluşturmaktadır. Bu viruslar, *Flaviviridae* ailesi *Flavivirus* cinsinde sınıflandırılan, 40-60 nm çaplı, zarflı ve sferik yapıli partiküllerdir. Viral genom, pozitif polariteli yaklaşık 11 kilobazlık tek iplikli RNA'dan oluşur<sup>2</sup>. Vektör kaynaklı flaviviruslar arasında tıbbi açıdan en önemli ve yaygın olanlar Batı Nil virusu (West Nile virus, WNV), kene kaynaklı ensefalit virusu (Tick-borne encephalitis virus, TBEV), Deng virusu (Dengue Virus, DENV) ve sarı humma virusu (Yellow Fever Virus, YFV)'dur<sup>3,4</sup>. Bu viruslardan WNV, DENV ve YFV için temel bulaş yolu sivrisineklerin kan emmesi iken, TBEV keneler aracılığıyla bulaşmaktadır<sup>4,5</sup>.

WNV'nin, doğal döngüsünde kuşlar ve özellikle *Culex* cinsi sivrisinekler rol alır. Virus için son konak olan atlar ve insanlar, rezervuar kuşlar ve sivrisinekler arasında gerçekleşen döngüde enfekte olmakta ancak döngüye katkıda bulunmamaktadır<sup>6</sup>. İnsanlarda WNV enfeksiyonları sıklıkla asemptomatik olmasına rağmen, enfekte kişilerin yaklaşık %20'sinde ateş, döküntü, artralji ve miyalji ile karakterize Batı Nil ateşi; %1'inde ise meningoensefalit, ensefalit ve paralizi gibi bulgular izlenen nöroinvasif enfeksiyon gelişebilmektedir<sup>7</sup>. Nöroinvasif ve ciddi seyreden enfeksiyonlar daha çok immün sistemi baskılanmış bireyler ile ileri yaştaki olgularda ortaya çıkmaktadır<sup>4</sup>. Ilman ve subtropikal bölgelerde WNV enfeksiyonu genellikle yaz veya erken sonbahar mevsiminde meydana gelmektedir. Tropikal bölgelerde insidans, sivrisineklerin en bol bulunduğu yağmurlu mevsimlerde en yüksektir<sup>2</sup>.

Kene kaynaklı ensefalit (Tick-borne encephalitis, TBE), Japonya ve kuzey Çin'den başlayarak Rusya ve Orta-Kuzey Avrupa'yı içine alan bir bölgede endemik olarak bulunur. Etkeni TBEV olan bu enfeksiyon, Avrupa ve Rusya'da en önemli flaviviral hastalık olarak dikkati çekmektedir<sup>8</sup>. Doğal döngüsünde *Ixodes* cinsi keneler ve çeşitli omurgalılar yer alır. TBEV enfeksiyonunda, mortalite izlenebilen ağır bir santral sinir sistemi (SSS) tutulumu ortaya çıkar. Etkilenen kişilerde ayrıca uzun dönemde nörolojik ya da psikiyatrik sekeller izlenmektedir. Son 30 yılda Avrupa'da TBEV nedeniyle ortaya çıkan SSS olgularında süregelen bir artış dikkati çekmektedir. TBEV enfeksiyonlarından korunmada ise etkili inaktive aşilar bulunmaktadır<sup>9</sup>.

DENV, dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak bulunur<sup>1</sup>. Virus başlıca *Aedes aegypti* cinsi sivrisineklerle taşınmaktadır<sup>10,11</sup>. Enfekte sivrisinekler duyarlı konaklara yaşamı boyunca virusu yaymaktadır. İnsan ana konak olup, kan dolaşımında bulunan virus hastalık kaynağını oluşturur<sup>11</sup>. DENV'nin antijenik olarak ilişkili dört serotipi (DENV-1,2,3,4) vardır<sup>10</sup>. Bu serotiplerin herhangi biriyle gelişen enfeksiyon sıklıkla asemptomatik olmakla birlikte, deng ateşi (humması) olarak adlandırılan kendini sınırlandıran grip benzeri ateşli hastalığa da neden olmaktadır. Olguların küçük bir oranında deng kanamalı ateşi ya da deng şok sendromu olarak adlandırılan vasküler permeabilite artışı, trombositopeni ve hemorajik belirtili yaşamı tehdit eden bir sendrom ortaya çıkar

bilmektedir. Dört serotipten herhangi biriyle primer enfeksiyon kalıcı immüniteye neden olmaktadır, ancak diğer serotiplere karşı koruyucu değildir<sup>12</sup>. Farklı serotip ile sekonder enfeksiyonlar ise sub-nötralizan çapraz reaktif antikorların makrofajlar içine girişi artırması sonucu kanamalı ateş gelişimiyle ilişkilendirilmektedir<sup>10</sup>. Her yıl dünya genelinde 100 milyon deng enfeksiyonunun ve 500 bin kadar da deng kanamalı ateşi olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir<sup>13</sup>. DENV enfeksiyonu, Orta-Güney Amerika ve Güneydoğu Asya ile DENV'nin yeni belirlendiği Afrika ile Karayip ve Pasifik adaları gibi dünyanın birçok tropikal bölgesinde endemiktir<sup>14</sup>. Son yıllarda kıtalar arası yoğun seyahat nedeniyle endemik bölgeleri ziyaret eden birçok duyarlı bireyin hastalıkla temas ettiği ve virusun Avrupa ülkelerine kadar taşındığı bildirilmektedir<sup>15</sup>.

Özellikle Anadolu yarımadasının güneyinde yer alan kısımları subtropikal bölge özelliklerine sahip olan ve birçok vektör sivrisinek türünün endemik olarak bulunduğu ülkemizde, flaviviruslar ile ilgili bilgiler hala görece olarak kısıtlı durumdadır<sup>16</sup>. Bu çalışmada, Akdeniz bölgesinde yer alan Mersin ili kan donörlerinde flavivirus seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma Popülasyonu ve Örnekler

Çalışmada serum örnekleri, Ağustos 2010 ve Nisan 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kan Merkezine başvuran 920 adet sağlıklı gönüllü kan donöründen elde edildi. Çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Başkanlığının etik onayı ile gerçekleştirildi (No. 2010/58) ve araştırmaya dahil edilen donörlerin hepsi, yapılacak çalışmayla ilgili olarak bilgilendirildi. Çalışmaya alınan donörlerin hepsi erkek olup, yaş ortalamaları 35.17 (yaş aralığı 18-63,  $SS \pm 9.56$ ) idi. Seçilen donörlerin herhangi bir kan transfüzyonu öyküsü olmayıp, rutin donör tarama testleri (HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve sifiliz) negatif olarak belirlendi. Sarı humma veya Japon ensefaliti aşılama öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı. Tüm serum örnekleri çalışılncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklandı.

### Tarama Testleri

Serum örneklerinin ilk değerlendirmesi, DENV IgG ve IgM antikorlarının ticari ELISA yöntemleri (Dengue ELISA IgG ve IgM Capture, Vircell Microbiologists, İspanya) ile araştırılması şeklinde gerçekleştirildi. Dört DENV serotipine karşı antikorları tespit edilebilen bu testlerde, DENV tip 1 (Hawaii suşu), tip 2 (New Guinea C suşu), tip 3 (H87 suşu) ve tip 4 (H241 suşu) izolatlarına ait immobilize antijenler kullanılmaktaydı. Üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalarda, çalışma sonunda her bir kuyunun absorbansı  $450/620 \text{ nm}$ 'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar antikor indeksinin hesaplanmasıyla değerlendirildi [Antikor indeksi= (örnek optik dansitesi/serum ortalama optik dansitesinin cut-off değeri) x 10]. Antikor indeksi < 9 olan örnekler negatif, 9-11 olan örnekler sınırda pozitif, > 11 olanlar ise pozitif olarak değerlendirildi. Testler için duyarlılık ve özgüllük %99.3 olarak rapor edilmiştir<sup>17</sup>.

## Doğrulama Testleri

Tarama testlerinde DENV IgG veya IgM pozitif olarak saptanan örnekler, *Flaviviridae* ailesinin diğer üyeleriyle çapraz reaksiyonları ekarte edebilmek ve izlenen reaktivitenin doğrulanması amacıyla, çeşitli ticari ve "in house" yöntemlerle yeniden değerlendirildi.

Çalışmada IgM pozitif olarak izlenen örnekler, akut ya da subakut DENV maruziyetinin doğrulanması için ticari bir immünokromatografik kombo test (SD Bioline Dengue Rapid Test, Standard Diagnostics, Güney Kore) ile viral NS1 antijeni ve IgM/IgG antikorları açısından analiz edildi. DENV IgG veya IgM testi pozitif olan bütün serum örnekleri indirekt immüno Floresan antikor testi (IIFT) ile YFV IgG ve ELISA yöntemiyle WNV IgG yönünden, ticari testler kullanılarak incelendi (Anti-YFV IgG IIFT, anti-WNV ELISA, Euroimmun, Almanya). Tüm testler, üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı ve değerlendirildi.

DENV IgG veya IgM testi pozitif saptanan örneklerin tamamı, WNV nötralizan antikorlarının saptanması için plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile değerlendirildi<sup>18</sup>. Bu amaçla WNV NY99-4132 suşu ve Vero hücreleri kullanıldı. Testte 1/5 oranında dilüe edilen serum örnekleri öncelikle 56°C'de 30 dakika inaktive edildi ve eşit hacimde %5 fetal dana serumu içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma-Aldrich, Almanya) içinde sulandırılmış virus [ $3 \times 10^5$  plak oluşturan ünite (pfu)/ml] ile karıştırıldı. Virus-antikor karışımı 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra, 0.2 ml olacak şekilde 24 çukurlu pleytlerde hazırlanan Vero hücre dizileri üzerinde 2 çukura inoküle edildi ve 2x DMEM içinde hazırlanan %3.2'lik karboksimetil selüloz (CMC; Sigma-Aldrich, Almanya) ile kaplandı. Pleytler %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edilerek plak oluşumu yönünden günlük olarak kontrol edildi ve dördüncü gün oluşan plaklar yönünden değerlendirildi. Kontrol virusun bulunduğu çukurlarda oluşan plak sayısının %80'inden fazlasının nötralize edildiği örnekler, nötralizan antikor varlığı yönünden pozitif olarak kabul edildi.

PRNT yöntemiyle WNV nötralizan antikorunu yönünden negatif olarak tespit edilen serum örnekleri, TBEV IgG ve IgM açısından IIFT (Anti-TBE IgG/IgM IIFT, Euroimmun, Almanya) ve nötralizan antikorlar açısından PRNT ile değerlendirildi. PRNT için 24 çukurlu pleytlerde hazırlanan PS hücreleri ve TBEV K23 suşu kullanıldı. Serumların L15 vasatı ile 1/5 oranında sulandırılması ve 56°C'de 30 dakika inaktivasyonun ardından 1/5-1/160 oranında 2 kat seri dilüsyonları yapıldı. Her serum dilüsyonu eşit miktarda (250 µl)  $1.67 \times 10^2$  pfu/ml virusla karıştırıldı; 37°C'de 30 dakika inkübasyonun ardından hücrelere eklendi. Dört saat 37°C'de inkübe edilen pleytler L15 vasatı içerisinde %1.6 olarak hazırlanan CLC eklenmesinin ardından 4 gün 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 30 dakika %3.7 formaldehid ve aynı süre naftalen siyahı ile fikse edilen hücrelerde plak sayımı yapıldı ve %90 nötralizasyon titresi hesaplandı<sup>19</sup>.

## BULGULAR

### Tarama Testlerine Ait Sonuçlar

Çalışmaya dahil edilen 920 sağlıklı kan donörünün 153 (%16.6)'ünde DENV IgG pozitifliği, 8 (%0.9)'inde ise IgM pozitifliği tespit edilmiştir. IgG pozitif 153 örneğin 132

(%86.3)'si pozitif ve 21 (%13.7)'i sınırdaki pozitif; IgM pozitif 8 örneğin 2 (%25)'si pozitif ve 6 (%75)'si sınırdaki pozitifdir. Bir örnekte eşzamanlı IgG ve IgM pozitifliği saptanmıştır (Tablo I). DENV IgG ve IgM pozitif sağlıklı kan donörlerinin yaş ortalamaları sırasıyla 41.42 (SS ± 10.74, p= 0.001) ve 34.38 (SS ± 6.78, p= 0.811) olarak hesaplanmıştır.

### Doğrulama Testlerine Ait Sonuçlar

DENV IgG ve/veya IgM pozitif 160 sağlıklı kan donörünün serum örnekleri, YFV IIFT, WNV ELISA ve WNV nötralizan antikorları yönünden PRNT yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Bu örneklerin 89 (%55.6)'u YFV IgG pozitif, 131 (%81.9)'i WNV IgG pozitif ve 137 (%85.6)'si WNV nötralizan antikor pozitif olarak bulunmuştur (Tablo I). ELISA yöntemi ile DENV IgM tespit edilen 8 örneğin tamamı, doğrulama amacıyla kullanılan NS1 antijen ve IgM/IgG antikor testlerinde negatif olarak izlenmiştir (Tablo II).

Tarama sonucu DENV IgG ve/veya IgM pozitif olarak izlenen ve WNV nötralizan antikor negatif toplam 23 (23/920, %2.5) serum örneğine ait sonuçlar, DENV, YFV ya da antijenik olarak benzerlik gösteren bir flavivirusa muhtemel maruziyet olarak değerlendirilmiştir (Tablo II). Bunlardan tarama testlerinde DENV IgM ya da DENV IgG + IgM pozitif olarak saptanan 4 örnek (No: 1-4, Tablo II), ticari kombo testlerde NS1 antijeni ve IgG/IgM antikorları açısından negatif olarak izlenmesi nedeniyle yalancı pozitiflik veya DENV-harici flavivirus maruziyeti olarak değerlendirilmiştir. DENV IgG sonuçları sınırdaki pozitiflik gösteren, diğer testleri ise negatif olarak saptanan 7 örnek ise (No: 5-11, Tablo II) yalancı pozitiflik olarak tanımlanmıştır. Bunların dışında kalan 6 örnekte (No: 12-17, Tablo II) sadece pozitif DENV IgG sonuçları izlenirken, diğer 6 örnekte (No: 18-23, Tablo II), DENV ile birlikte diğer çeşitli flavivirus testleriyle de pozitif/sınırdaki pozitif sonuçlar izlenmiştir. Bu örnekler de DENV ya da flavivirus maruziyeti olarak yorumlanmıştır.

### TARTIŞMA

Günümüzde flavivirus enfeksiyonlarının tanısında; viral RNA'ların moleküler yöntemlerle saptanması, viral antijenlerin ve virusa karşı oluşan antikorların serolojik yöntemlerle araştırılması ve daha az sıklıkla uygulansa da virusun hücre kültürü ya da duyarlı türlerde

**Tablo I.** DENV IgG ve/veya IgM Pozitif Bulunan Örneklerin WNV, YFV ve TBEV Test Sonuçları (n= 160)

		DENV IgM pozitif	DENV IgG pozitif	Toplam (%)
DENV IgG ve/veya IgM pozitif örnekler (n= 160)	YFV-IIFT pozitif	2	87	89 (55.6)
	WNV-ELISA pozitif	-	131	131 (81.8)
	WNV-PRNT pozitif	4	133	137 (85.6)
WNV PRNT negatif örnekler (n= 23)	TBEV-IIFT-IgM pozitif	-	-	-
	TBEV-IIFT-IgG pozitif	-	2	2 (1.25)
	TBEV- PRNT pozitif	-	-	-

Tablo II. Çeşitli Tarama ve Doğrulama Testlerinde Reaktivite Saptanan ve WNV PRNT Negatif İzlenen Örneklerde Sonuçların Dağılımı

No	Yaş	DENV IgG ELISA	DENV IgM ELISA	DENV NS1- IgM/G kombine	YFV IgG IIFT	WNV IgG ELISA	TBEV IgG IIFT	TBEV IgM IIFT	TBEV PRNT
1	31	N	P	N	N	N	N	N	-
2	46	N	SP	N	N	N	N	N	-
3	36	N	SP	N	N	N	N	N	-
4	33	P	P	N	P	N	N	N	-
5	44	SP	N	-	N	N	N	N	-
6	26	SP	N	-	N	N	N	N	-
7	35	SP	N	-	N	N	N	N	-
8	45	SP	N	-	N	N	N	N	-
9	31	SP	N	-	N	N	N	N	-
10	32	SP	N	-	N	N	N	N	-
11	42	SP	N	-	N	N	N	N	-
12	35	P	N	-	N	N	N	N	-
13	42	P	N	-	N	N	N	N	-
14	46	P	N	-	N	N	N	N	-
15	31	P	N	-	N	N	N	N	-
16	21	P	N	-	N	N	N	N	-
17	31	P	N	-	N	N	N	N	-
18	49	P	N	-	SP	P	Y	Y	-
19	31	P	N	-	P	P	Y	Y	-
20	43	P	N	-	N	SP	N	N	-
21	27	P	N	-	SP	P	N	N	-
22	37	P	N	-	P	P	P	N	N
23	63	P	N	-	P	P	P	N	N

P: Pozitif; N: Negatif; SP: Sınırdaki örnek; DENV: Dengue virus; YFV: San humma virusu; WNV: Batı Nil virusu; TBEV: Kene ensefaliti virusu; IIFT: İndirekt immünofloresans testi; PRNT: Plak redüksiyon nötralizasyon testi.

izolasyonu yaklaşımları uygulanmaktadır. Bununla birlikte serolojik yöntemler, flavivirus enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan yaklaşımdır<sup>20,21</sup>. Klinik olgularda viremi süresinin görece olarak kısa, virus yükünün ise düşük olması nedeniyle laboratuvar tanısında genellikle özgül antikorların tespit edilmesi yaklaşımı tercih edilmektedir<sup>22</sup>. Flavivirus enfeksiyonlarının serolojik tanısında; hemagglütinasyon inhibisyon testi (HI), ELISA ve IIFT gibi birçok yöntem uygulanmaktadır<sup>23</sup>. Bununla birlikte serolojik testlerde, flavivirusların ortak antijenleri nedeniyle çapraz reaksiyonlar ortaya çıkmakta, izolataın kesin olarak tanımlanabilmesi için nötralizasyon ya da PRNT testleri gerekmektedir<sup>23,24</sup>. PRNT, flavivirusların ayırıcı serolojik tanısında "altın standart" yöntem olarak kabul edilmektedir<sup>25</sup>. Bu çalışmada, coğrafi ve ekolojik özellikleri ile çeşitli vektör kaynaklı flavivirusların aktivitesi için uygun olan ülkemizin, Akdeniz bölgesinde yer alan Mersin ilinde yaşayan kan donörlerinde, önde gelen patojen flaviviruslarla temas, çeşitli serolojik testlerle değerlendirilmiştir.

Çalışma süresince kan donörlerinden elde edilen toplam 920 serum örneği ELISA testi ile DENV antikorları yönünden taranmış ve 160 (%17.4) örnek reaktif olarak saptanmıştır. Bu örneklerin 153 (%16.6)'ünde IgG, 8 (%0.9)'inde IgM pozitifliği mevcut olup, bir örnekte eş zamanlı IgG ve IgM reaktivitesi izlenmiştir. Pozitif örneklerde doğrulama testleri olarak DENV antijen-antikor kombo testi, YFV, WNV ve TBEV gibi yaygın olarak izlenen diğer patojen flaviviruslara yönelik IIFT ve ELISA testlerinin yanı sıra; tüm örneklerde WNV PRNT, IIFT reaktif örneklerde ise TBEV PRNT uygulanarak, saptanan pozitifliğin hangi virusa özgül antikor varlığını gösterdiği araştırılmıştır. WNV PRNT ile incelenen örneklerin %85.6 (137/160)'sı pozitif olarak belirlenmiş, incelenen popülasyonda yaygın olarak izlenen maruziyetin WNV'ye karşı olduğu ortaya konmuştur. WNV maruziyeti, 30 yılı aşkın süredir ülkemizde hayvanlar ve insanlarda araştırılmaktadır<sup>26,27</sup>. Virusun ülkemizin Orta, Batı, Güney (Akdeniz bölgesi) ve Güneydoğu Anadolu gibi değişik bölgelerinde dolaşımında olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Türkiye'de WNV aktivitesinin sporadik olduğu ve insan temaslarının çoğunun asemptomatik serokonversiyon ile sonuçlandığı belirtilmektedir<sup>16</sup>. Çeşitli memeli türlerinde WNV'ye karşı oluşan nötralizan antikor varlığını araştıran bir çalışmada, insanların %20.4 (18/88)'ünde WNV nötralizan antikorları pozitif bulunmuştur<sup>18</sup>. Yapılan bir çalışmada WNV aktivitesi, Güneydoğu Anadolu'da yaşayan 181 kişinin %9.4'ünde WNV nötralizan antikorlarının varlığının gösterilmesiyle doğrulanabilmiştir<sup>28</sup>. Orta/Kuzey Anadolu bölgesinde 2516 kan donöründe gerçekleştirilen yaygın bir seroprevalans çalışmasında, WNV nötralizan antikor varlığı Orta Anadolu'da yaşayan 14 (%0.56) donörde gösterilmiştir<sup>29</sup>. Yine Orta Anadolu'da 1200 kan donöründe PRNT doğrulama testinden sonra %0.8 oranında WNV pozitifliği rapor edilmiştir<sup>30</sup>. Yakın zamanlarda ise Trakya bölgesinde 296 kan donörünün %1.7'sinde WNV nötralizan antikorunun ve klinik olarak doğrulanmış olgularda WNV RNA'sının gösterildiği belirtilmiştir<sup>31</sup>.

Ülkemizde 2009 yılı ve sonrasında çeşitli sporadik olgular ile 2010 yılının Ağustos ayında Ege bölgesinde çeşitli illeri etkileyen bir WNV salgını izlenmiştir<sup>16,32</sup>. 2011 yılında ise insan ve atlarda eş zamanlı olarak görülen akut nöroinvasif WNV enfeksiyonlarında köken 1 (grup 1a) suşları tanımlanmıştır<sup>33</sup>. Mersin bölgesinde grubumuzun yaptığı



güncel bir çalışmada, asemptomatik erişkinlerden oluşan farklı bir kohortta WNV seroprevalansı %12.1 olarak izlenmiş, çalışma grubunda viremi saptanmamış, aynı bölgede atlarda yapılan örneklemede ise nötralizan antikor pozitifliği %8.2 olarak tespit edilmiştir<sup>34</sup>. Bölgede yapılan entomolojik süreyans sonucunda vektör özelliği bilinen çeşitli sivrisinek türlerinde virus saptanmıştır<sup>34</sup>. Bu durum Mersin bölgesinde WNV aktivitesini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu çalışmada %14.9 (137/920) olarak saptanan seroprevalans değeri, önceki verilere benzerlik göstermektedir. Bölgemizde vektör sivrisineklerin aktif olduğu aylarda ortaya çıkan ateşli hastalık ve viral SSS enfeksiyonlarının etiolojisinde WNV mutlaka düşünülmelidir.

Çalışmada tüm örneklerin %2.5 (23/920)'inde, WNV dışında çeşitli flaviviruslarla maruziyete işaret eden serolojik bulgular elde edilmiştir (Tablo I). Örneklerin dördünde ilk tarama ile akut veya subakut DENV maruziyetini düşündüren sonuçlar (IgM veya IgM + IgG pozitifliği) gözlenmiş, ancak bu veriler akut enfeksiyonlarda saptanabilen NS1 antijeni ya da alternatif bir testle antikor pozitifliği izlenememesi nedeniyle doğrulanamamıştır (Tablo II). İki örnekte diğer viruslarla birlikte TBEV serolojisinin de pozitif olması nedeniyle bu örnekler PRNT yöntemiyle değerlendirilmiş; ancak negatif sonuç alınmıştır (Tablo II). Bunların dışında kalan 19 örneğin %30.4'ünde DENV IgG açısından sınırdaki, %26.1'inde ise pozitiflik saptanmış, geriye kalan %26.1 örnekte de DENV ve test edilen diğer flaviviruslarla birlikte pozitiflik izlenmiştir. Tanımlanan bu örneklerde DENV nötralizasyonu ya da PRNT uygulanmamış olması nedeniyle, izlenen serolojik profillerin DENV maruziyetini gösterdiği kesin olarak kanıtlanmamıştır. Ek olarak DENV nötralizasyon testleri; sonuçların kesin olarak değerlendirilebilmesi için tüm virus serotipleri ya da bölgede bulunduğu düşünülen serotiplerin teste alınması gerektiğinden uygulanma güçlükleri gösteren testlerdir. Türkiye'de insan ve DENV teması ilk olarak İzmir ilinde 81 sağlıklı bireyde DENV-1, 2 ve 4 antijenleri kullanılarak HI yöntemiyle araştırılmış ve bireylerin %3.7'sinde DENV-1, %9.8'inde DENV-2 ve %20.9'unda DENV-4 HI reaktivitesi bildirilmiştir<sup>35</sup>. Aynı bölgede yapılan ve 1074 bireyin dahil edildiği bir çalışmada ise, HI yöntemiyle DENV-1'in %2.79, DENV-2'nin %5.30 ve DENV-4'ün %9.77 oranında saptandığı belirtilmiş; nötralizasyon yöntemiyle DENV-1 seroreaktivitesi %53.3 (16/30), DENV-2 %2.1 (1/47) ve DENV-4 %0.9 (1/104) olarak saptanmıştır<sup>36</sup>. Ülkemizde Orta Anadolu'da 2435 kan donöründe yapılan başka bir çalışmada, anti-DENV IgG antikorları %0.86 (21/2435) oranında izlenmiş; sınırdaki IgG pozitif veren iki örnekte DENV IgM varlığı tespit edildiği ve bunlardan birinin DENV NS1 antijeni yönünden sınırdaki pozitif bulunduğu belirtilmiştir<sup>37</sup>. Takip örneklemleri ve çeşitli serolojik testlerin sonuçları, Orta Anadolu'da muhtemelen DENV-2 serotipine maruziyeti düşündüren niteliktedir<sup>37</sup>. Bu sonuçlar, ülkemizde DENV ya da antijenik benzerlik gösteren bir virusun aktivitesine işaret etmektedir. Çalışmamızda da tek başına ya da diğer flavivirus (YFV, WNV, TBEV) antijenleri ile birlikte izlenen DENV seroreaktivitesi saptanmıştır (Tablo II). Örneklerin bir bölümünde birden fazla virusa karşı izlenen pozitifliklerin, flaviviruslara ait serolojik testlerde ortaya çıkan ve iyi tanımlanmış çapraz reaksiyonlar sonucu ortaya çıkması kuvvetle muhtemeldir<sup>38</sup>. Bu durum DENV harici, muhtemelen düşük virülansa sahip flavivirusların dolaşımında olduğuna işaret etmektedir. Pozitif saptanan kan donörlerinin

YFV ya da TBEV gibi herhangi bir flavivirus aşısı öyküsü olmaması da, bu görüşe dolaylı olarak kanıt sunmaktadır. DENV vektörü olabilecek çeşitli sivrisinek türleri ülkemizde bulunmaktadır; ayrıca özellikle Avrupa'da virusun bulaşmasından sorumlu *Aedes albopictus* da son yıllarda tespit edilmiştir<sup>39</sup>. Türkiye'de henüz maruziyet veya bulaşmanın ülke sınırları içerisinde olduğu doğrulanmış DENV olgusu tanımlanmamıştır. Diğer yandan, yurt dışından ülkemize gelen yabancı uyruklu bir hastada doğrulanmış deng ateşi olgusu bildirilmiştir<sup>40</sup>. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, özellikle tanısız mikrobiyoloji laboratuvarında flavivirus serolojisine ait sonuçların yorumlanması konusunda da dikkatli olunması gerektiğini yeniden ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, Mersin ilinde yaşayan sağlıklı kan donörlerinde %12.1 oranında WNV seropozitifliği belirlenmiş, ayrıca bölgede WNV ve TBEV dışı flavivirusların muhtemel sirkülasyonuna işaret eden ilk epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Planlanacak ayrıntılı vektör ve serolojik sürveyans çalışmalarının yanı sıra, sık karşılaşılan etkenlerin saptanmadığı uygun klinik semptomatolojiye sahip olgularda WNV ve diğer flaviviruslara yönelik tanısız testlerin uygulanmasıyla, bölgede bulunan flaviviruslar net olarak belirlenebilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 480-96.
2. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. Lancet Infect Dis 2002; 2(9): 519-29.
3. Monath TP. Flaviviruses, pp: 763-814. In: Fields BN, Knipe DM (eds), Virology. 1990, 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, New York.
4. Sips GJ, Wilschut J, Smit JM. Neuroinvasive flavivirus infections. Rev Med Virol 2012; 22(2): 69-87.
5. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. Lancet Infect Dis 2014; pii: S1473-3099(14)70834-5.
6. Rosà R, Marini G, Bolzoni L, et al. Early warning of West Nile virus mosquito vector: climate and land use models successfully explain phenology and abundance of *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Italy. Parasit Vectors 2014; 7(1): 269.
7. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. Emerg Infect Dis 2005; 11(8): 1174-9.
8. Pugliese A, Beltramo T, Torre D. Seroprevalence study of Tick-borne encephalitis, *Borrelia burgdorferi*, Dengue and Toscana virus in Turin Province. Cell Biochem Funct 2007; 25(2): 185-8.
9. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10(12): 1040-55.
10. Sekaran SD, Lan EC, Maheswarappa KB, Appanna R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. J Infect Dev Ctries 2007; 1(2): 182-8.
11. Mumtaz A, Afzal N, Sami W, Tahir R, Javeed K, Mehmood S. Evaluation of four ELISA based immunoassays for the detection of IgM antibodies against dengue virus. Biomedica 2010; 26(1): 54-7.
12. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, et al. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. Am J Trop Med Hyg 1999; 60(4): 693-8.
13. Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. Trop Med Int Health 2006; 11(8): 1238-55.

14. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(8): e1760.
15. Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, Tappe D, et al. Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013. *Euro Surveill* 2014; 19(3): pii: 20681.
16. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(6): 731-41.
17. Zafar H, Hayyat A, Akhtar N. Incidence of primary dengue viral infection in healthy adults of Rawalpindi, Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2011; 61(10): 1030-1.
18. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 2006; 134(4): 826-9.
19. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and neutralization, pp: 25-46. In: Mahy BWJ, Kangro HO (eds), *Virology Methods Manual*. 1996, 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA.
20. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 2004; 80(948): 588-601.
21. De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res* 2012; 43(1): 16.
22. Stiasny K, Aberle SW, Heinz FX. Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Euro Surveill* 2013; 18(43): pii:20614.
23. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(11): 6049-83.
24. Martin DA, Biggerstaff BJ, Allen B, Johnson AJ, Lanciotti RS, Roehrig JT. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(3): 544-9.
25. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* 2013; 195(1): 33-40.
26. Radda A. Studies on the activity and ecology of arboviruses in Turkey. *Zentralbl Bakteriol* 1973; 225(1): 19-26.
27. Meco O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul* 1977; 11(1): 3-17.
28. Ergunay K, Ozer N, Us D, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in south-eastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(2): 157-61.
29. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğın S, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10(8): 771-5.
30. Ayturan S, Aydoğın S, Ergünay K, Özcebe OI, Us D. Investigation of West Nile virus seroprevalence in Hacettepe University Hospital blood donors and confirmation of the positive results by plaque reduction neutralisation test. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 113-24.
31. Erdem H, Ergunay K, Yilmaz A, et al. Emergence and co-infections of West Nile virus and Toscana virus in Eastern Thrace, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(4): 319-25.
32. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012; 17(21): pii: 20182.
33. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *Int J Infect Dis* 2013; 17(7): e546-51.

34. Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O, et al. Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(7): e3028.
35. Serter F. Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. EU Tıp Fak Mec 1968; 7(1): 1-13.
36. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in Aegean region of Turkey, pp: 155-61. In: Vesenjak-Hirjan J, Calisher C (eds), Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl Bakt (Suppl 9), 1980. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
37. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, et al. Investigation of Dengue virus and yellow fever virus seropositivities in blood donors from Central/Northern Anatolia, Turkey. Mikrobiyol Bul 2010; 44(3): 415-24.
38. Niedrig M, Sonnenberg K, Steinhagen K, Paweska JT. Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. J Virol Methods 2007; 139(1): 103-5.
39. Oter K, Gunay F, Tuzer E, Linton YM, Bellini R, Alten B. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding. Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13(10): 753-61.
40. Uyar Y, Aktaş E, Yağcı Çağlayık D, Ergönül O, Yüce A. An imported dengue Fever case in Turkey and review of the literature. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 173-80.