

# ORTA/KUZEY ANADOLU BÖLGESİ KAN DONÖRLERİNDE DENGUE VİRUSU VE SARI HUMMA VİRUSU SEROPOZİTİFLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI\*

## INVESTIGATION OF DENGUE VIRUS AND YELLOW FEVER VIRUS SEROPOSITIVITIES IN BLOOD DONORS FROM CENTRAL/NORTHERN ANATOLIA, TURKEY

Koray ERGÜNAY<sup>1</sup>, Mehmet B. SAYGAN<sup>2</sup>, Sibel AYDOĞAN<sup>1</sup>, Nadine LITZBA<sup>3</sup>, Matthias NIEDRIG<sup>3</sup>, Ahmet PINAR<sup>1</sup>, Dürdal US<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Ünitesi, Ankara. (ekoray@hacettepe.edu.tr)

<sup>2</sup> Türk Kızılayı, Orta Anadolu Bölgesel Kan Merkezi, Ankara.

<sup>3</sup> Robert Koch-Institute, Centre for Biological Safety (ZBS-1), Berlin, Almanya.

### ÖZET

Dengue virusu (DENV) ve sarı humma virusu (Yellow Fever Virus; YFV), vektörle bulaşan flaviviruslar arasında global olarak önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde bu virüslerle ilgili olarak yapılan tek çalışmada, Ege bölgesinde yaşayan popülasyonda DENV seropozitifliği doğrulanmış ve hemagglütinasyon inhibisyon testiyle YFV'ye karşı antikor varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin Orta/Kuzey Anadolu bölgesinde yaşayan popülasyonda DENV ve YFV'ye karşı seropozitifliğin araştırılması ve bu virüslerle olası karşılaşmanın gösterilmesidir. Çalışmada, Türk Kızılayı Orta Anadolu Bölgesel Kan Merkezi koordinasyonunda Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak Kızılay kan merkezlerinde, onaylanmış kan donörlerinden bilgilendirilmiş onam sonrasında toplanan ve önceden Batı Nil virusu ve kene ensefaliti virusu açısından negatif olarak değerlendirilen serumlar incelenmiştir. Toplam 2435 ve 1502 serum, sırasıyla DENV ve YFV IgG antikorları açısından, ticari enzim (ELISA) ve immünofloresans (IIFT) temelli indirekt katı faz yöntemleri (Euroimmun, Almanya) ile değerlendirilmiştir. DENV IgG reaktif örnekler ek olarak, ELISA yöntemi ile IgM, mozaik IIFT yöntemi ile DENV serotipleri (DENV 1-4) açısından incelenmiş; IgM pozitif örneklerde ayrıca ticari bir NS1 antijen saptama sistemi (Bio-Rad Laboratories, Fransa) uygulanmıştır. YFV IgG reaktif örnekler ise IIFT ve mozaik IIFT yöntemleriyle IgM açısından değerlendirilmiş, ayrıca antikor özgüllüğünün doğrulanması için plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) uygulanmıştır. Anti-DENV IgG antikorları, örneklerin %0.9 (21/2435)'unda tekrarlayan çalışmalarda gösterilmiş; IgG sınırda pozitif iki örnekte IgM varlığı saptanmış, bunlardan birisinde de NS1 antijen testi sınırda pozitif olarak değerlendirilmiştir.

\* Bu çalışma Türk Kızılayı ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiş (Proje No. 08 O 101 001) ve ön sonuçlar/veriler iki farklı poster halinde 12. European Society for Clinical Virology (27-30 Eylül 2009, İstanbul) ve 20. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (10-13 Nisan 2010, Viyana) Kongrelerinde sunulmuştur.

dirilmiştir. IgG pozitif serumların %14.3 (3/21)'ünde mozaik IIFT pozitif olarak saptanmış ve DENV-2'ye karşı belirgin reaktivite izlenmiştir. DENV IgG pozitif beş donörden en az altı ay sonra yeni serum örnekleri elde edilmiş, bunların 4'ünde IgG reaktivitesinin devam ettiği saptanmıştır. İlk çalışmada IgM pozitif, IgG ve NS1 antijeni sınırdan pozitif olan örnek ise, ikinci örneklemede IgM negatif ve IgG pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yeni örneklerin 3'ünde IIFT yönteminde DENV-1 ve DENV-2 serotiplerine karşı reaktivite izlenmiştir. Anti-YFV IgG antikorları ise incelenen örneklerin %0.6 (9/1502)'sında belirlenmiş, IgG reaktif örneklerde YFV IgM ve PRNT negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, predominant olarak DENV-2 serotipine karşı olmak üzere DENV seropozitifliği, Orta Anadolu illeri olan Ankara ve Konya'da ilk defa gösterilmiş; ancak YFV'ye karşı saptanan seropozitif sonuçlar PRNT yöntemiyle doğrulanamamıştır. Bu sonuçlar, çalışma bölgesinde DENV ya da antijenik olarak benzer bir flavivirusun olası varlığına ve sporadik insan maruziyetine işaret etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Dengue virusu, sarı humma virusu, seroprevalans, Anadolu, Türkiye.*

## ABSTRACT

Dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YFV) are two of the globally prevalent vector-borne flaviviruses. Data on these viruses from Turkey is limited to a single study originating from the western, Aegean region of Turkey, where evidence for DENV exposure had been confirmed in residents and presence of hemagglutination inhibiting antibodies against YFV had been revealed. The aim of this study was to investigate the rates of seropositivity of DENV and YFV in blood donors from Central/Northern Anatolia, Turkey, for the demonstration of possible human exposure. Serum samples were collected by the Turkish Red Crescent Middle Anatolia Regional Blood Center from donation sites at Ankara, Konya, Eskişehir and Zonguldak provinces and included in the study after informed consent. Ankara is the capital and second most-populated city in Turkey. All samples were previously evaluated for West Nile and tick-borne encephalitis virus antibodies and found to be negative. A total of 2435 and 1502 sera have been evaluated for IgG antibodies against DENV and YFV, respectively. Commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and indirect immunofluorescence tests (IIFTs) were applied (Euroimmun, Germany) for DENV/YFV IgG surveillance. DENV IgG reactive sera were further evaluated for IgM by ELISA and a commercial mosaic IIFT to determine DENV subtypes. IgM positive samples were also analyzed by a commercial NS1 antigen detection assay (Bio-Rad Laboratories, France). YFV IgG reactive samples were evaluated by IIFT for IgM and via mosaic IIFT and antibody specificity were confirmed by plaque reduction neutralization test (PRNT). Anti-DENV IgGs were demonstrated in repeated assays in 0.9% (21/2435) of the sera. In two samples with borderline IgG results, presence of DENV IgM was detected, one of which was also borderline positive for DENV NS1 antigen. In 14.3% (3/21) of the IgG reactive sera, mosaic IIFT was evaluated as positive and displayed prominent reactivity for DENV-2 in all samples. From five donors with DENV reactivity, new samples were obtained after at least six months which revealed the continuing presence of DENV IgG activity in four. One sample which was initially positive for IgM, borderline for NS1 antigen and borderline for IgG was observed to be positive for IgG and negative for IgM in redonation. IIFT results in three redonation samples also indicated reactivity for DENV-1 and DENV-2 subtypes. Anti-YFV IgGs were detected in 0.6% (9/1502) of the sera. YFV IgM could not be demonstrated in any of the IgG reactive samples and PRNT was evaluated as negative. In conclusion, evidence for DENV exposure, presumably to DENV-2, was identified in residents from Central Anatolian provinces of Ankara and Konya for the first time, however, seroreactivity detected against YFV could not be confirmed by PRNT. These findings indicated that DENV or an antigenically-similar flavivirus was probably present in the study region and sporadic human exposure might have occurred.

**Key words:** *Dengue virus, yellow fever virus, seroprevalence, Anatolia, Turkey.*

## GİRİŞ

Flaviviruslar, insanlarda enfeksiyon oluşturan ve farklı aileler içinde sınıflandırılan yaklaşık 100 arbovirus arasında önemli bir yere sahiptir. *Flavivirus* cinsi, zarflı, sferik yapılı ve tek iplikli pozitif polariteli RNA içeren *Flaviviridae* ailesi içinde yer almaktadır<sup>1</sup>. Vektörle bulaşan flaviviruslar olan Dengue ve sarı humma virusları ise, özellikle belirli coğrafi bölgelerde ciddi halk sağlığı sorunu teşkil eden en önemli viruslardır<sup>2,3</sup>. Dengue virusu (DENV) için ana vektör *Aedes* cinsi sivrisineklerdir. Virüsle karşılaşan kişilerde asemptomatik serokonversiyonun yanı sıra, ateş, lenfadenopati, döküntü, eklem ve kas ağrıları ile karakterize deng ateşi (kemikkıran) izlenebilmekte; ayrıca olguların bir bölümünde deng kanamalı ateşi/deng şok sendromu adı verilen ağır klinik tablolar gelişebilmektedir. Virusun, epidemiyolojik özellikleri farklı olan 4 serotipi (DENV 1-4) vardır ve hemorajik ateş/şok tablosunun gelişmesinde farklı serotiplerle reeneksiyonların etkili olduğu bilinmektedir. Günümüzde 100'ü aşkın ülkede görülen deng ateşi açısından 2.5 milyar kişinin global olarak risk altında olduğu düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre her yıl dünyada 50-100 milyon kişinin deng ateşinden, 250.000-500.000 kişinin ise hemorajik ateş/şok sendromundan etkilenmesi söz konusudur. DENV için aşı çalışmaları halen devam etmektedir<sup>2,4-6</sup>.

İlk kez 1927 yılında Batı Afrika'dan izole edilen sarı humma virusu (Yellow Fever Virus; YFV) ise, gerek içinde bulunduğu aileye gerekse cinse (*Flavivirus*) ismini veren (sarı, Latince flavus) prototip virustur<sup>1</sup>. Enfekte kişilerde özgül olmayan bulgular ve abortif enfeksiyondan fatal hemorajik ateşe kadar değişen geniş bir çerçevede belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın adını almasında, enfekte olguların %15-25'inde izlenen hepatorenal bulgular ve sarılık rol oynamıştır. YFV günümüzde Afrika ve Orta/Güney Amerika'da endemiktir, ancak tarihsel olarak Avrupa ve Kuzey Amerika'da da büyük salgınlara neden olduğu bilinmektedir<sup>7</sup>. YFV'nin bulaşında vektör görevi gören *Aedes* cinsi sivrisineklerin, hastalığın rapor edilmediği ülkelerde de bulunması dikkat çekicidir. Asya kıtasının, YFV saptanmamasına rağmen, duyarlı büyük bir insan popülasyonuna sahip olması ve kompetan vektörlerin bulunması nedeniyle risk altında olduğu söylenmektedir<sup>3,7</sup>. Korunma amacıyla uzun yıllardır kullanımda olan, YFV 17D suşundan hazırlanmış güvenilir bir canlı atenüe aşı mevcuttur ve endemik bölgelere seyahat durumlarında önerilmektedir<sup>3</sup>.

Ülkemizde DENV ve YFV ile ilgili tek kaynak, Serter'in<sup>8</sup> 1980 tarihli çalışmasıdır. Bu çalışmada Ege bölgesinde yaşayan kişilerden elde edilmiş toplam 1074 serum örneği hemaglutinasyon inhibisyon (HI) yöntemiyle incelenmiş, aralarında DENV ve YFV de olmak üzere birçok arbovirusun seroprevalansı araştırılmıştır. Serter<sup>8</sup> çalışmasında DENV ve YFV seropozitifliklerini sırasıyla %12.6 ve %9.7 olarak bildirmiştir. Görüldüğü gibi, çalışmanın yapıldığı Ege bölgesinde, YFV ve DENV aktivitesine işaret eden veriler bulunmaktadır. Ancak ülkemizin geri kalan bölgelerindeki durum belirsizdir. Konuyla ilgili veri eksikliğinin giderilmesi amacıyla planlanan bu çalışmada, Orta ve Kuzey Anadolu bölgesinde çeşitli illerde yaşayan kan donörlerinde, DENV ve YFV seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### İncelenen Örnekler

Çalışmaya Ocak-Nisan 2009 tarihleri arasında, Türk Kızılayı Orta Anadolu Bölgesel Kan Merkezi destek ve koordinasyonunda; Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak illerinde yer alan Kızılay kan merkezlerinde donör olarak kabul edilen kişilere ait toplam 2435 serum, bilgilendirilmiş onam alınmasını takiben dahil edildi. Her bölgeden çalışmaya katılan kişi sayısı, illerin nüfuslarına göre belirlendi. Çalışma Türk Kızılayı ve Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. Sarı humma veya herhangi bir flavivirus aşısı ile endemik bölgelere seyahat öyküsü veren kişiler çalışma dışında bırakıldı. %12.5'i kadınlardan oluşan çalışma grubunda ortalama yaş 34.26 yıl (aralık: 19-64, standart sapma: 13.72) olarak hesaplandı. Örnekler kuru buz üzerinde nakledildi ve alikotlara ayrıldıktan sonra -20°C ve -80°C'de saklandı. Tüm örnekler, bu çalışmaya dahil edilmeden önce diğer flaviviruslardan Batı Nil virusu (West Nile Virus, WNV) ve kene ensefaliti virüsü (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) açısından değerlendirilen ve negatif sonuç elde edilen örneklerdi.

### DENV Tarama Testleri

Örneklerde DENV IgG antikorlarının saptanması için ticari bir ELISA kiti (Anti-Dengue Virus IgG ELISA, Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Örnekler, üreticinin önerileri doğrultusunda kantitatif olarak değerlendirildi; sonuçlar her testte örneklerle birlikte çalışılan, bilinen titrede antikor içeren kalibratörlerin değerleri baz alınarak çizilen standart eğri kullanılarak "mililitrede rölatif ünite" (RU/ml) şeklinde ifade edildi. Buna göre, < 16 RU/ml olan örnekler "negatif", 16-22 RU/ml olan örnekler "sınırdaki pozitif" ve ≥ 22 RU/ml olan örnekler "pozitif" olarak kabul edildi.

DENV IgG pozitif örnekler, ek olarak IgM açısından da ticari bir ELISA kiti (Anti-Dengue Virus IgM ELISA, Euroimmun, Almanya) ile test edildi. Değerlendirmenin yarı-kantitatif olarak yapıldığı testte hasta örneklerinin kalibratör değerlerine oranı > 1.1 olduğunda "pozitif", < 0.8 olduğunda "negatif", 0.8-1.1 arasında olduğunda ise "sınırdaki pozitif" olarak kabul edildi.

### YFV Tarama Testleri

Örnekler YFV IgG antikorları açısından, ticari bir indirekt immüno floresan kiti (IIFT) ile (Anti Yellow Fever Virus IgG IIFT; Euroimmun, Almanya), üreticinin önerileri doğrultusunda 1/100 seyreltilerek incelendi. Reaktif sonuçlar kalitatif olarak, mikroskopta izlenen floresans yoğunluğunun pozitif kontrolle karşılaştırılması ile "sınırdaki zayıf (+)", "orta (++)" ve "güçlü (≥ +++)" pozitif olarak değerlendirildi.

YFV IgG pozitif örnekler ayrıca diğer bir ticari IIFT kiti (Anti Yellow Fever Virus IgM IIFT; Euroimmun, Almanya) ile IgM antikorları açısından incelendi. Bu amaçla, yine üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan 1/100 oranında seyreltilmiş serum örnekleri kullanıldı.

DENV ve YFV tarama testlerinin ilk çalışmasında reaktif olarak bulunan örneklerle, aynı testler yeniden uygulandı ve tüm tekraralarda pozitif veya sınırda pozitif olarak izlenen örnekler reaktif kabul edildi.

### DENV Doğrulama Testleri

DENV IgG'si pozitif olarak izlenen örneklerde, ilgili serotiplerin araştırılması için mozaik biyoçip şeklinde ticari bir IIFT kiti (Flavivirus Profile 2 IgG IIFT; Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Testler üreticinin önerileri doğrultusunda çalışıldı ve yukarıda açıklandığı şekilde değerlendirildi. Ayrıca, seçilen bazı örnekler DENV-2'ye karşı IgM ve IgG antikorlarının saptanması için geliştirilmiş prototip ELISA sistemleri ile (Euroimmun, Almanya) kantitatif olarak yukarıda açıklandığı şekilde incelendi. DENV IgM'si pozitif olarak izlenen örnekler, viral NS1 antijeni açısından ticari bir strip testi ile (Dengue NS1 Ag Strip, Bio-Rad Laboratories, Fransa) üreticinin önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

### YFV Doğrulama Testleri

Antikor özgüllüğünün doğrulanması için, YFV açısından reaktif tüm örnekler küçük modifikasyonlarla uygulanan standart plak redüksiyon nötralizasyon (PRNT) testi ile değerlendirildi<sup>9</sup>. Buna göre, pozitif serum örneklerinin iki kat sulandırılmaları hazırlanarak aynı miktarda (250 µl, 200 PFU/ml) YFV referans suşu (17D, 354/1) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Hazırlanan PS hücresi (Pig kidney epithelial cell) süspansiyonu ( $6 \times 10^5$  hücre/ml) 24-çukurlu hücre kültürü pleytlerine 200 µl olacak şekilde eklendi, her dilüsyon için iki çukur ayrılan pleytlere 200 µl virus + serum dilüsyonu eklendi. 37°C'de dört saat inkübasyonun ardından hücreler 400 µl (L15 vasatı içinde, %1.6'lık) karboksi-metil selüloz ile kaplandı. Dört gün 37°C'de inkübasyondan sonra %3.7 formalin ile 20 dakika hücreler fikse edildi, naftalen siyahı ile 30 dakika boyanma sonrası yıkanarak kurutuldu. Her çukurda oluşan plaklar sayılarak %90 plak azalmasına neden olan serum dilüsyonları saptandı; buna göre  $\geq 1:10$  titreler "pozitif",  $< 1:10$  titreler "negatif" kabul edildi.

### BULGULAR

Tekrarlayan çalışmalarda anti-DENV IgG antikorları; 16'sı pozitif (16/2435; %0.7), 5'i sınırda pozitif (5/2435; %0.2) olmak üzere toplam 21 örnekte (21/2435; %0.9) reaktif olarak izlenmiştir (Tablo I). IgG reaktif örneklerin mozaik IIFT testlerinde ise üç örnekte (3/21, %14.3) DENV açısından pozitiflik izlenmiş; bunların ikisinde DENV-2'ye karşı (++), birinde ise DENV-2'ye karşı (+++) ve DENV-1'e karşı (+) reaktivite gözlenmiştir.

DENV IgG reaktif örnekler IgM açısından incelendiğinde, IgG sınırda pozitif 2 örnekte IgM antikorları da pozitif olarak bulunmuştur (2/21, %9.5). Bu örneklerle uygulanan viral NS1 antijen testi örneklerin birisinde negatif, diğerinde sınırda pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Saptanan DENV seroreaktivitesinin ayrıntılı olarak yorumlanabilmesi amacıyla, pozitif olarak izlenen kan donörlerine yeniden ulaştırılması ve örnekleme yapılması planlanmıştır. Çalışmalar sonucunda beş donörden ikinci serum örneği elde edilmiş ve değerlendirilmiştir (Tablo II). Örneklerin dördünde (No: 2-4; Tablo II) DENV IgG pozitifliği ikinci ör-

**Tablo 1. Çalışılan Örneklerde İzlenen DENV ve YFV Antikor Sonuçları ve Illere Göre Dağılımı**

	DENV						YFV					
	IgG			IgM*			IgG			IgM*		
	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)		Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)		Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)		Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	
Ankara (n= 1342)	15 (1.1)	1327 (98.9)		1 (6.7)	14 (93.3)	Ankara (n= 924)	5 (0.5)	919 (99.5)		0 (0)	5 (100)	
Konya (n= 665)	5 (0.8)	660 (99.2)		1 (20)	4 (80)	Konya (n= 305)	3 (1)	302 (99)		0 (0)	3 (100)	
Eskişehir (n= 233)	1 (0.4)	232 (99.6)		0 (0)	1 (100)	Eskişehir (n= 149)	1 (0.7)	148 (99.3)		0 (0)	1 (100)	
Zonguldak (n= 195)	0 (0)	195 (100)		-	-	Zonguldak (n= 124)	0 (0)	124 (100)		-	-	
Toplam (n= 2435)	21 (0.9)	2414 (99.1)		2 (9.5)	19 (90.5)	Toplam (n= 1502)	9 (0.6)	1493 (99.4)		0 (0)	8 (100)	

\* IgM testleri sadece IgG pozitif örneklerde uygulanmıştır.  
DENV: Dengue virüsü, YFV: Yellow fever virus.

**Tablo II. Yeniden Örneklemeye Yapılan Kan Donörleri ve DENV Test Sonuçları**

Örnek No.	Yaş/Cinsiyet/ Bölge	İlk örnek				İkinci örnek			
		DENV IgG ELISA	DENV IgM ELISA	DENV-2 ELISA	Mozaiik IgG IIFT	DENV IgG ELISA	DENV IgM ELISA	DENV IgG ELISA	Mozaiik IgG IIFT
1	41/K/Konya	SP	P	IgG: SP, IgM: P	N	N	SP	P	DENV-2 (++) DENV-1 (++)
2	34/E/Konya	P	N	IgG: P IgM: N	N	N	N	P	DENV-2 (++) DENV-1 (++)
3	54/E/Konya	P	N	IgG: P IgM: N	N	N	N	P	N
4	30/E/Ankara	SP	N	IgG: N IgM: N	DENV-2 (+++)	N	N	P	DENV-2 (++) DENV-1 (++)
5	32/E/Konya	P	N	IgG: P IgM: N	N	N	N	P	N

\* Sadece IgM pozitif 1 no'lu örneğe uygulanmıştır. P: Pozitif, N: Negatif, SP: Sınırdaki pozitif.

nekte de saptanmış, maruz kalınan serotipin DENV-2 olduğuna işaret eden ELISA/IIFT sonuçları not edilmiştir. Bir numaralı örnekte ise ilk çalışmada IgM pozitif, IgG sınırdan pozitif ve NS1 antijeni sınırdan pozitifken, yeniden alınan örnekte IgM negatifleşirken IgG'nin ELISA'da pozitif, mozaik IIFT'de ise DENV-1 ve DENV-2 IgG için reaktif olduğu dikkat çekmiştir (Tablo II). İlk örneklere uygulanan prototip DENV-2 ELISA'dan, standart ELISA yöntemi ile örneklerin dördünde (No: 1, 2, 3, 5; Tablo II) paralel sonuçlar elde edilmiş, sadece başlangıçta sınırdan pozitif sonuç alınan 4 numaralı örnek, DENV-2 ELISA testinde negatif olarak izlenmiştir. Yeni örneklemeler, ilk örneklemeden en az altı ay sonra yapılmıştır. İlk veya ikinci örnekleme sırasında kişilerde deng ateşi ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir hastalık öyküsü bulunmamaktadır. Yeni örneklerde anti-TBEV IgM/IgG antikorları ve anti-WNV IgG antikorları negatif olarak izlenmiştir.

YFV IgG antikorları, IIFT yöntemiyle değerlendirilen toplam 1502 örneğin 9 (9/1502, %0.6)'unda ilk ve tekrarlayan değerlendirmede pozitif olarak izlenmiştir (Tablo I). Floresans yoğunlukları pozitif örneklerin %66.7 (6/9)'sinde sınırdan-zayıf (+), %33.3 (3/9)'ünde ise orta (++) düzeyde olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde ELISA yöntemiyle DENV antikorları saptanmamıştır. Mozaik IIFT'de ise beş örnek YFV açısından sınırdan pozitif, diğer örnekler negatif olarak saptanmıştır. Üç örnekte ise mozaik IIFT'de DENV açısından pozitiflik saptanmış; bunların hepsinde DENV-2, birisinde DENV-2'ye ek olarak DENV-1, sonuncusunda ise DENV-1, 2 ve 4'e ait bölgelerde sınırdan pozitiflik izlenmiştir. Tüm örneklerde YFV IgM IIFT ve PRNT sonuçları ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

## TARTIŞMA

Ülkemizde vektörlerle bulaşan viral enfeksiyonlar ya da arboviruslarla ilgili çalışmalar henüz göreceli olarak sınırlı sayıda olmasına karşın, flaviviruslar arasında özellikle WNV ve TBEV'nin ülkemizdeki aktivitesine işaret eden güçlü veriler bulunmaktadır<sup>10-13</sup>. Ancak, özellikle endemik olduğu ülkelerde önemli halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen ve tüm dünyada en yaygın arbovirus enfeksiyonlarından birisi olan deng ateşi, ek olarak da YFV'nin ülkemizdeki aktivitesi konusundaki bilgilerimiz çok kısıtlıdır<sup>8</sup>. Çalışmamız, incelenen örnek sayısı ve tarama bölgesinin genişliği açısından konuyla ilgili yapılmış en kapsamlı çalışma, ayrıca Orta/Kuzey Anadolu bölgesinde DENV ve YFV'nin seroprevalansının araştırıldığı ilk çalışma olması açısından özellik taşımaktadır.

Çalışmamızda, DENV IgG antikorları açısından incelenen örneklerin %0.9 (21/2435)'unda pozitif veya sınırdan pozitiflik şeklinde reaktif sonuçlar elde edilmiştir. Reaktif örneklerin IgM açısından incelenmesi sonucunda, %9.5 (2/21) oranında pozitiflik saptanmış; IgM pozitif örneklerin birisi, DENV NS1 antijeni açısından da sınırdan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerdeki IgG aktivitesi, dört donörden alınan yeni örneklerin değerlendirmesi sonucunda da doğrulanmış; antijen testi ve IgM açısından reaktif, IgG sınırdan pozitif olarak saptanan diğer bir donörün ikinci örneğinde IgM'nin negatifleştiği, buna karşın IgG'nin kesin pozitif olduğu izlenmiştir. Yeniden örneklemeler arasında en az altı aylık bir süre bulunduğu bu durumda; kişiden ilk örneğin karşılaşma sonrasında, virusun dolaşımdan temizlenmesi sürecinde alındığı, ikinci örneğin ise bu sürecin tamamlanması aşamasına karşılık geldiği akla gelmektedir. Primer DENV enfeksiyonlarında, virusla kar-

şılaştıktan dört ay ve sonrasında IgM/IgG antikorlarının saptama sınırının altına düştüğü, buna karşın sekonder enfeksiyonlarda IgG'nin 10 ay sonrasında dahi tespit edilebildiği bilinmektedir<sup>5</sup>. Yine sekonder enfeksiyonlarda IgG antikorları erken dönemde pozitifleşmekte ve saptanmaları IgM ile eş zamanlı olmaktadır<sup>5</sup>. Bu bilgilerin ışığında, söz edilen donördeki serolojik profilin sekonder enfeksiyona daha uygun olduğu görülmektedir. Yine de DENV enfeksiyonlarında serolojik tanı, diğer flaviviruslara göre ek güçlükler arz etmektedir. Dört serotipe sahip DENV'nin serotiplerinden birisi ile gerçekleşen enfeksiyonda, diğer serotiplere bağlanabilen ancak nötralizan olmayan antikorların oluştuğu; kişinin diğer serotiplerle enfeksiyonu sonucu bu antikorların sentezinin de arttığı bilinmektedir<sup>2,3</sup>. Bu özellik nedeniyle sekonder enfeksiyonlarda serolojik testlerle virus serotipinin belirlenmesi çok güçtür<sup>2,4,5</sup>.

Serter'in<sup>8</sup> 1980 tarihli çalışmasında DENV seroprevalansı, 1074 kişiden oluşan Ege bölgesi kökenli sağlıklı kişilerden oluşan popülasyonda HI yöntemi ile %12.6 olarak bulunmuş; DENV-1, 2 ve 4 antijenleri ile ayrı ayrı yapılan HI testinde ise oranlar sırasıyla %2.8, %5.3 ve %9.8 olarak belirlenmiştir. Uygulanan nötralizasyon testlerinde ise en sık karşılaşılan serotipin DENV-1 olduğu (%53.3), bunu DENV-2 (%2.1) ve DENV-4'ün (%0.96) izlediği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda, serotipe özgül ELISA ve IIFT testlerinin sonuçları DENV-2'nin baskın serotip olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte bazı örneklerde DENV-1'e işaret eden bulgular da elde edilmiştir (Tablo II). Serolojik test sonuçlarının doğrulanmasında altın standart olan nötralizasyon testleri, yukarıda açıklandığı nedenlerden dolayı DENV enfeksiyonlarında çeşitli güçlükler arz etmektedir. Çalışmamızda, kesin sonuç elde edebilmek için tüm serotiplerin kullanılması ve her serotip için yöntem optimizasyonu gerekmesi nedeniyle DENV nötralizasyon testleri yapılmamıştır. Bu durum, elde edilen verilerin kesinleştirilmesi açısından bir kısıtlılık oluşturmaktadır.

DENV için temel vektör türü sivrisineklerdir, ayrıca diğer *Aedes* cinsi sivrisineklerin, özellikle de *A.albopictus*'un bulaşmaya neden olabildiği bilinmektedir<sup>2</sup>. Ülkemizde *A.albopictus*'un varlığı henüz gösterilememiştir; ancak coğrafi ve ekolojik özellikler göz önüne alındığında bu tür ya da vektör olarak görev yapabilecek diğer türlerin bulunabilmesinin mümkün olduğu dikkati çekmektedir<sup>14</sup>.

Günümüzde YFV ve sarı humma, Sahra-altı Afrika ve Orta/Güney Amerika ülkelerinde endemiktir<sup>3,7</sup>. *A.aegypti* vektörlerinin bulunmasına karşın sarı hummanın Asya/Pasifik bölgesinde neden yaygınlaşmadığı konusu günümüzde tartışılmaktadır<sup>7</sup>. Ülkemiz de klasik olarak YFV açısından riskli kabul edilen bölgelerin dışında yer almaktadır. Çalışmamızda YFV seroprevalansının araştırılmasının nedeni; Ege bölgesinde önceden saptanan seropozitifliğe rağmen PRNT ile doğrulanmış veri bulunmaması, YFV ile DENV için vektör türlerin ortak olması, ayrıca ülkemizde bulunan diğer flaviviruslara ait serolojik testlerden elde edilen sonuçların daha sağlıklı olarak değerlendirilmesi için veri sağlanması amacına yöneliktir. Serter'in<sup>8</sup> çalışmasında YFV antikorları, 1074 kişiden oluşan çalışma grubunda HI yöntemiyle %9.7 oranında saptanmıştır. Ancak yukarıda bahsedilen sarı humma epidemiyolojik özellikleri ve Türkiye veya komşu ülkelerden herhangi bir olgu bildirimini olmaması nedeniyle, elde edilen sonuçların flaviviruslar arasında görülen çapraz reaksiyonlara bağlı olduğu yorumu yapılarak doğrulama testlerine gidilmemiştir<sup>8</sup>. Bizim çalışmamızda

%0.6 (9/1502) oranında YFV IgG antikor pozitifliği saptanmış, pozitifliğin tekrarlayan testlerde devam etmesi üzerine IgM incelenmesi ve PRNT yöntemi uygulanmış, ancak tüm örneklerden olumsuz sonuç alınmıştır (Tablo I). Reaktif olarak değerlendirilen IIFT sonuçlarının önemli bir bölümü (%66.7) sınırdan-zayıf pozitif olarak izlenmiştir. İlginç olarak YFV pozitif örneklerin üçünde mozaik IIFT'de, DENV-2 her örnekte ortak olmak üzere DENV-1, 2 ve 4 serotipleri için reaktivite saptanmıştır. Benzer şekilde önceki bir çalışmamızda, tarama sırasında WNV testleri reaktif olan ancak PRNT testi negatif olarak izlenen üç örnekte DENV IIFT ve/veya ELISA testleri pozitif olarak izlenmiştir<sup>12</sup>.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen veriler, Orta Anadolu bölgesi Ankara ve Konya illerinde sporadik olarak DENV ile karşılaşmanın gerçekleştiğini ve predominant serotipin DENV-2 olduğunu işaret eder niteliktedir. Saptanan YFV seroreaktivitesi ise PRNT yöntemiyle doğrulanamamıştır.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar destekleri için Katja Steinhagen ve Sabine Lederer'e (Euroimmun AG, Almanya) teşekkür eder.

## KAYNAKLAR

1. Monath TP. Flaviviruses, pp: 763-814. In: Fields BN, Knipe DM (eds), *Virology*. 1990, 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, New York.
2. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644-52.
3. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 11-20.
4. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 480-96.
5. Shu PY, Huang JH. Current advances in Dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 642-50.
6. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem, pp: 1-22. In: Gubler DJ, Kuno G (eds), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. 1997. CAB International, New York.
7. Barrett ADT, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 2007; 52: 209-29.
8. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zbl Bakt* 1980 (S9): 155-61.
9. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* 1998; 56: 159-67.
10. Özkul A, Yıldırım Y, Pınar D, et al. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 2005; 29: 1-4.
11. Ergünay K, Özer N, Us D, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in Southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 157-61.
12. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, et al. West Nile Virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10 (DOI: 10.1089=vbz.2009.0130)
13. Esen B, Gozalan A, Coplu N, et al. The presence of tick-borne encephalitis in an endemic area for tick-borne diseases, Turkey. *Trop Doct* 2008; 38: 27-8.
14. Knudsen AB, Romi R, Majori G. Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. *J Am Mosq Control Assoc* 1996; 12: 177-83.