

SAĞLIKLI KAN VERİCİLERİNDE BATI NİL VİRUSU SEROPREVALANSININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF WEST NILE VIRUS SEROPREVALENCE IN HEALTHY BLOOD DONORS

Kenan HİZEL¹, İdil YENİCESU^{2,3}, Berna ERDAL^{3,4}, Emine YEŞİLYURT⁴, Işıl FİDAN⁴, Ayşe KALKANCI⁴, Günter DİLSİZ³

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara. (khizel@gazi.edu.tr)

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Bankası, Ankara.

⁴ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Flaviviridae ailesinde yer alan Batı Nil virusu (BNV), zarflı, ikozahedral simetrlili, tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virusu olup, insana sivrisinek ısırığı ile bulaşmaktadır. BNV, konakta asemptomatik enfeksiyondan, orta düzeyde ateş veya ensefalite kadar değişebilen klinik tablolara neden olabilir. Dünyada çok sayıda sporadik olgu ve salgın bildirimi yapılmış olmasına rağmen, Türkiye'den yapılmış çalışma sayısı kısıtlıdır. Bu çalışmada, Ankara bölgesi sağlıklı kan donörlerinde BNV seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 2821 kan donöründen bilgilendirilmiş onam alınmasını takiben kan örnekleri toplanmış, demografik verileri kaydedilerek BNV'ye karşı oluşmuş IgG tipi antikorlar, ticari bir ELISA yöntemi kullanılarak (WNV IgG ELISA, Euroimmun, Almanya) araştırılmıştır. İncelenen örneklerin 28 (%0.9)'inde BNV IgG pozitif, 41(%1.4)'inde ise sınırdan pozitif reaksiyon izlenmiş; böylece toplam 69 (%2.4) donörde BNV ile karşılaşma olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir. IgG pozitif ve sınırdan pozitif örnekler (n=69) ile rastgele seçilen 60 adet IgG negatif örnek, viral RNA varlığı açısından ticari bir ters transkripsiyon, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (reverse transcription, real-time PCR) (LightMix® Kit West Nile Virus, TIB Molbiol, Almanya) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, incelenen 129 örnekte BNV RNA'sı saptanamamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, ülkemizde BNV enfeksiyonu varlığına işaret eden diğer çalışmaları destekler niteliktedir. BNV enfeksiyonlarının ülkemizdeki kan bankacılığı açısından muhtemel risklerinin değerlendirilmesi için ise daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Kan donörü, Batı Nil virusu, seroprevalans, Türkiye.

* Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 01/2007-08 kodu ile desteklenmiş ve "50. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy" (ICAAC, Boston, ABD, 2009) Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) which is a flavivirus transmitted by mosquitos, may lead to asymptomatic infection, mild febrile illness or encephalitis. Many sporadic cases and major outbreaks of West Nile fever have been reported worldwide, however, WNV infections have not been well documented in Turkey. The aim of the present study was to determine the prevalence of past WNV infections in a population of blood donors. Blood samples were collected from donors with their informed consent. Samples were processed and tested for WNV IgG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Euroimmun, Germany) according to the manufacturer's guidelines. Demographic data of the donors were recorded. A total of 2821 serum samples were tested. Among them, 28 samples were found to be WNV IgG positive (0.9%) and 41 of them were indeterminate (1.4%). Thus a total of 69 objects were considered to have encountered WNV (2.4%). All of the IgG positive samples (n= 69) and randomly-selected negative samples (n= 60) were re-analysed for the presence of viral RNA by a commercial real-time reverse transcriptase PCR (LightMix® Kit West Nile Virus, TIBMolbiol, Germany). West Nile virus RNA was not found in any of the samples. In conclusion, our data have supported the results of other studies indicating the presence of WNV infection in Turkey. Further larger scale studies are necessary to evaluate the possible risks of WNV infections in our country in terms of blood banking.

Key words: Blood donors, West Nile virus, seroprevalence, Turkey.

GİRİŞ

Batı Nil virusu (BNV), zarflı, ikozahedral simetrikli, tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virusu olup, Dengue, Japon ensefaliti virusu, kene ensefaliti virusu ve sarı humma viruslarının bulunduğu *Flaviviridae* ailesinde sınıflandırılmaktadır. Virusun hayat döngüsü doğada özellikle *Culex* cinsi sivrisinekler ile kuşlar arasında gerçekleşmektedir. Bu döngü sırasında insanlar ve diğer memeliler de geçici konaklar olabilir. İnsanlar en çok sivrisinek sokması sonucu enfekte olurlar. Aynı zamanda, kan nakli, organ nakli ya da emzirme ile anneden bebeğe bulaş da olabilmektedir¹.

Son bildirilen salgınlarda olguların %80'inde enfeksiyonun asemptomatik seyrettiği ifade edilmiştir². Ateş, baş ağrısı ve makülopapüler döküntü ile seyreden orta düzeyde hastalık ise olguların %20'sinde görülmektedir. Olguların %1'den azında ölüme neden olabilen nöroinvazif hastalık gelişmektedir.

Batı Nil virusunun ilk kez 1937 yılında Uganda'nın bir köyünde ateşli bir kadın hastanın kan örneğinde gösterilmesinden sonra 1999 yılına kadar çok sayıda salgın ve olgu bildirimini yapılmıştır. Salgınlar arasında uzun zaman aralıkları bulunması nedeniyle, bu hastalık önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmemiştir. New York'da 1999 yılında ortaya çıkan viral ensefalit salgını nedeniyle sağlık otoriteleri bu hastalık üzerinde durmaya başlamışlardır³. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) tarafından 1999 yılından sonra Kuzey ve Güney Amerika, Afrika, Orta Doğu, Avrupa ve Asya'dan bildirilen 24.000'den fazla olgu doğrulanmıştır⁴. Ülkemizde memelilerde ve insanlarda BNV seropozitifliğini gösteren az sayıda çalışma yapılmış olup, toplumumuzda bu virus ile enfeksiyonun varlığıyla ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, kan vericilerinde BNV seropozitifliğinin gösterilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2821 sağlıklı kan vericisinin serum örnekleri dahil edildi. Kan vericilerinden onay alındıktan sonra kan örnekleri toplandı ve serumları ayrılarak -80°C 'de saklandı. Kan vericilerine ait demografik veriler kaydedildi. BNV IgG antikorları, yarı-kantitatif olarak ticari bir enzim immünolojik yöntemi (ELISA) ile (WNV IgG, Euroimmun, Almanya) üreticinin önerileri doğrultusunda araştırıldı.

Çalışmada ayrıca, ELISA ile reaktif bulunan 69 örnek ile rastgele olarak seçilen 60 seronegatif örnek olmak üzere toplam 129 örnekte BNV RNA'sının varlığı araştırıldı. Bu amaçla "High Pure RNA Tissue Kit" (Roche, Almanya) kullanılarak serum örneklerinden total RNA izole edildi. RNA saflaştırma etkinliği ve miktarları spektrofotometrik olarak ölçülerek (NanoDrop, ABD) kontrol edildi. Daha sonra "1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR" (AMV) (Roche, Almanya) sistemi üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılarak komplementer DNA (cDNA) oluşturuldu. BNV RNA'sının saptanması için ticari bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sistemi (LightMix[®] Kit West Nile Virus, TIBMolbiol, Almanya) kullanıldı. Bu sistemde BNV genomundan NS5 bölgesine ait 11 baz çiftlik amplikonlar çoğaltılmaktadır. Amplifikasyon karışımı "Light Cyler Fast Start DNA Master^{PLUSH}ybProbe" (Roche, ABD) kullanılarak hazırlandı. Reaksiyonlarda kit içinde sunulan ve 10^1 - 10^6 hedef molekül/reaksiyon olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda bulunan standartlar da eş zamanlı olarak kullanıldı. Amplifikasyon, "Fluorescence resonance energy transfer (FRET)" teknolojisi kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı; 95°C 'de 10 dakika denatürasyon, 95°C 'de 5 saniye, 57°C 'de 15 saniye, 72°C 'de 25 saniye olarak 45 döngülük çoğaltma ve 40°C 'den 95°C 'ye kadar floresans okunması basamaklarını içeren protokol şeklinde uygulandı.

Verilerin değerlendirilmesi 640 nm dalga boyunda "LightCycler Software version 2.0" ile yapıldı. Veriler SPSS 10.0 istatistik paket programına girildi. İstatistiksel karşılaştırmada Fisher kesin ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 2821 sağlıklı kan vericisinin 2653'ü erkek, 168'i kadın olup, yaş ortalamaları 34.88 ± 9.3 (18-65) yıl olarak hesaplanmıştır. Toplam 2821 serum örneğinin 28 (%0.9)'ünde BNV IgG antikor pozitifliği saptanmış; 41 (%1.4) örnekte ise sonuç sınırda pozitif olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla toplam 69 (%2.4) örneğin BNV serolojisi için reaktif olduğu kabul edilmiştir. Pozitiflik saptanan donörlerin yaş aralığının 20-64 yıl (ortalama: 39) arasında değiştiği; 2'sinin kadın olduğu ve 7'sinin Ankara ili dışında yaşadığı görülmüştür. Sınırdaki pozitif bulunanların ise biri kadın olup yaş aralıkları 22-55 yıl (ortalama: 34) arasındadır ve 4'ü Ankara dışından gelerek kan bağışında bulunmuştur.

ELISA sonuçlarının moleküler bir yöntem sonuçları ile karşılaştırmak amacıyla toplam 129 örnekte uygulanan gerçek zamanlı PCR yönteminde, çalışılan tüm örnekler viral RNA açısından negatif olarak izlenmiştir.

TARTIŞMA

BNV coğrafi olarak tüm Afrika, Avrupa, Amerika ve Asya kıtalarına yayılmış olup, başta sivrisinekler olmak üzere kuş, insan ve diğer memelilerden izole edilmiştir. Ülkemizde BNV ile ilgili yapılan çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Enfeksiyonun ülkemizde varlığının ilk serolojik kanıtı 1970'li yıllarda Meço⁵ tarafından gösterilmiş ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde 937 kişinin serum örneklerinde BNV seropozitifliği hemagglütinasyon inhibisyon yöntemiyle %42.8 gibi oldukça yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada seropozitifliğin yaşla birlikte arttığı vurgulanmıştır⁵. 1980 yılında Serter⁶ tarafından yapılan çalışmada, aynı yöntemle %29.1 oranında seropozitiflik saptamıştır⁶. 2006 yılında Özkul ve arkadaşları⁷, BNV seropozitifliğini katırlarda %2.5, sığırlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, koyunlarda %1 ve insanlarda %20.4 olarak bildirmiştir. Güneydoğu Anadolu bölgesinde 2007 yılında yapılan bir çalışmada ise, 181 sağlıklı kişiden alınan serum örneklerinin %16'sında indirekt immün floresan antikor testiyle pozitiflik bulunmuş, bu seropozitifliklerin %9.5'i plak redüksiyon nötralizasyon (PRNA) testi ile doğrulanmıştır⁸. Çalışmamız, şimdiye kadar Türkiye'den bildirilen en geniş kapsamlı iki çalışmadan biridir. Yakın tarihli diğer çalışmada, 2516 sağlıklı kan vericisi ELISA yöntemi ile taranmış ve pozitif bulunan 25 (%0.99) örnek PRNA yöntemi kullanılarak doğrulandığında, %0.56 BNV pozitifliği gösterilmiştir⁹. Bu çalışma da bizimkine benzer şekilde Orta Anadolu bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Toplam 2821 örneği taradığımız bizim çalışmamızda doğrulanmamış seropozitiflik oranı %2.4 olarak bulunmuştur. Güneydoğu Anadolu bölgesine göre Orta Anadolu bölgesinde sivrisineklerle bulaşan enfeksiyonların daha az görüldüğü bilinmektedir. BNV seropozitifliği bu bölgesel farklılığa uygun olarak, her iki çalışmada diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda BNV seroprevalansı değişiklik göstermektedir. Gana'da yaşayan erişkinlerde %27.9 olarak bildirilen seropozitiflik, sivrisinek temasının daha az görüldüğü, sağlık ve hijyen koşullarının daha iyi olduğu ABD'nin Nebraska eyaletinde %9.5 oranında saptanmıştır^{10,11}. Bu çalışmada aynı zamanda sivrisineklerde BNV pozitifliğinin yüksek olduğu bölgelerdeki insanlarda seropozitifliğin de yüksek olduğu vurgulanmıştır¹¹. Kanada'da yapılan bir çalışmada, kırsal kesimde yaşayanlarda %9.9 olarak saptanan seropozitifliğin kentlerde 6 kat azaldığı belirtilmiştir¹². Hastalığın Avrupa ülkelerindeki insidansı ise birkaç salgın dışında pek bilinmemektedir. Çek Cumhuriyetinde %2.1 iken, İtalya'da sağlıklı bireylerde seropozitiflik saptanmamıştır^{13,14}. İspanya'da PRNA ile 504 sağlıklı bireyin serum örnekleri araştırılmış, özellikle kırsal kesimde yaşayanların serumlarında olmak üzere %0.6 pozitiflik bulunmuştur¹⁵. 1994 ile 2001 yılları arasında Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde çıkan çeşitli salgınlarda 1474 kişinin hastalandığı belirlenmiştir¹⁶. Benzer salgınlara gelecekte de hastalığın prevalansını değiştirebileceği, çevresel ve iklim faktörlerinin bu prevalansa etkili olacağı açıktır.

Flaviviridae ailesinde yer alan viruslar arasında tanınan serolojik testlerde çok yüksek düzeyde çapraz reaksiyonlar izlendiği bilinmekte ve bu durumun ayırt edilebilmesi için IgG seropozitifliklerinin doğrulanması gerektiği vurgulanmaktadır^{17,18}. Bizim çalışmamızda BNV tarama testi olarak ELISA yöntemi kullanılmış, sonuçlar viral nükleik asit varlığı açı-

sından PCR ile tekrar edilmiş ve ELISA reaktif 69 örnek ile rastgele seçilen 60 seronegatif örnek olmak üzere toplam 129 örneğin tümünden PCR ile negatif sonuç alınmıştır. Moleküler yöntemlerin BNV enfeksiyonlarının tanısında önemli bir yeri bulunmaktadır¹⁹⁻²². Diğer doğrulama testleri olarak PRNA veya virus izolasyonu yapılması da önerilmektedir²³. Ancak laboratuvarımızın güvenlik düzeyinin canlı virus partikülleri ile çalışmaya uygun olmaması nedeniyle bu yöntemlerin kullanılması mümkün olmamıştır. Serolojik olarak IgG antikorlarının gösterilmesi için ELISA yönteminin kullanılabilmesi bildirilmektedir^{24,25}. Bu nedenle çalışmamızda ELISA yöntemi kullanılmıştır. Ancak, flavivirus ailesinin diğer üyeleri ile oluşabilecek çapraz reaksiyonları göz önüne alınarak sonuçlar "reaktif" olarak kabul edilmiştir.

Batı Nil virus enfeksiyonunun kan nakliyle de kişiden kişiye bulaşabileceği bilinmektedir^{26,27}. Bu nedenle özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde kan vericilerinin serumlarında moleküler yöntemlerle araştırma yapılması önerilmektedir²⁸. Ancak bizim ve Ergünay ve arkadaşlarının⁹ verileri, seropozitifliğin oldukça düşük olduğu bölgemiz kan donörlerinde BNV araştırmasının gerekli olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmanın bulguları, ülkemizdeki BNV enfeksiyonu varlığını desteklemektedir. Ancak hastalığın insidans ve prevalansını saptamak için, farklı coğrafi bölgelerde ve konaklarda yapılacak geniş kapsamlı epidemiyolojik ve klinik çalışmalar yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Petersen LR, Hayes EB. West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am* 2008; 92: 1307-22.
2. Gubler DJ. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1039-46.
3. Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA. The West Nile virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 413-8.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Arboviral encephalitis. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/> Accessed: August 21, 2007.
5. Meço O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul* 1977; 11: 3-17.
6. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey, pp: 155-61. In: Venenjak-Hirjan J, Calisher C (eds), *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Suppl. 9, 1980. Stuttgart Gustav Fischer Verlag, Germany.
7. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcalı A, Yılmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 826-9.
8. Ergünay K, Ozer 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.
9. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; Dec 20. [Epub ahead of print]
10. Wang W, Sarkodie F, Danso K, et al. Seroprevalence of West Nile virus in Ghana. *Viral Immunol* 2009; 22: 17-22.
11. Schweitzer BK, Kramer WL, Sambol AR, Meza JL, Hinrichs SH, Iwen PC. Geographic factors contributing to a high seroprevalence of West Nile virus-specific antibodies in humans following an epidemic. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 314-8.

12. Schellenberg TL, Anderson ME, Drebot MA, et al. Seroprevalence of West Nile virus in Saskatchewan's Five Hills Health Region, 2003. *Can J Public Health* 2006; 97: 369-73.
13. Spataro P, Scoglio ME, Di Pietro A, et al. Seroprevalence study on the diffusion of the West Nile virus among blood donors, healthcare workers, jockeys, grooms and fowlers, veterinary surgeons and hunters in Messina (Italy). *J Prev Med Hyg* 2008; 49: 22-5.
14. Hubálek Z, Savage HM, Halouzka J, Juricová Z, Sanogo YO, Lusk S. West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland. *Viral Immunol* 2000; 13: 427-33.
15. Bernabeu-Wittel M, Ruiz-Pérez M, del Toro MD, et al. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2007; 25: 561-5.
16. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 147-56.
17. Allwinn R, Doerr HW, Emmerich P, Schmitz H, Preiser W. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Med Microbiol Immunol* 2002; 190: 199-202.
18. Niedrig M, Mantke OD, Altman D, Zeller H. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 72.
19. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods* 2007; 146: 355-8.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Update: West Nile virus screening of blood donations and transfusion-associated transmission-United States, 2003. *MMWR* 2004; 53: 281-4.
21. Custer B, Kamel H, Kiely NE, Murphy EL, Busch MP. Associations between West Nile virus infection and symptoms reported by blood donors identified through nucleic acid test screening. *Transfusion* 2009; 49: 278-88.
22. Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD. Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3661-7.
23. Yazıcı Z. Batı Nil virusu enfeksiyonu. *İnfeksiyon Derg* 2005; 19: 139-43.
24. Ludolfs D, Niedrig M, Paweska JT, Schmitz H. Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 467-73.
25. Martin DA, Noga A, Kosoy O, Johnson AJ, Petersen LR, Lanciotti RS. Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile virus and St Louis encephalitis virus infection during the 2002 West Nile virus epidemic in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 1130-3.
26. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus transmission through blood transfusion-South Dakota, 2006. *MMWR* 2007; 56: 76-9.
27. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med* 2005; 353: 460-7.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Detection of West Nile virus in blood donations-Puerto Rico, 2007. *MMWR* 2008; 57: 577-80.