

Mersin Bölgesi Kan Donörlerinde Flebovirus Maruziyetinin Serolojik Olarak Araştırılması

Serological Investigation of Phlebovirus Exposure in Blood Donors from the Mediterranean Province of Mersin, Turkey

Seda TEZCAN¹, Ender DİNÇER², Mahmut ÜLGER³, Didem ÖZGÜR¹, Semra ERDOĞAN⁴, Aykut ÖZKUL⁵, Gürol EMEKDAŞ¹, Koray ERGÜNAY⁶

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji, Araştırma ve Eğitim Merkezi, Mersin.

² Mersin University Advanced Technology, Research and Education Center, Mersin, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

⁴ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Mersin.

⁴ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Mersin, Turkey.

⁵ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁵ Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara, Turkey.

⁶ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁶ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 26.03.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 01.06.2015

ÖZ

Etken olan virus tipine bağlı olarak, ateşli hastalık ve/veya meningoensefalit oluşturan fleboviruslar, çeşitli arthropod vektörlerle insana bulaşan, zarflı ve segmentli RNA viruslarıdır. Kum sineği ateşi ya da tatarcık humması etkeni olarak tıbbi öneme sahip fleboviruslar arasında prototip izolatlar "sandfly fever Sicilian virus (SFSV)" ve "sandfly fever Naples Virus (SFNV)"dir. SFSV varyantı olan "sandfly fever Cyprus virus (SFCV)" da benzer klinik tablolardan sorumludur. Toskana virus (TOSV) ise, merkezi sinir sisteminde enfeksiyon oluşturma özelliği ile diğer fleboviruslardan ayrılır. Bu seroepidemiolojik çalışmada, flebovirus aktivitesi konusunda sınırlı veri bulunan Mersin ili ve çevresinde ikamet eden sağlıklı erişkinlerde, tıbbi önemi olan fleboviruslara maruziyetin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kan Merkezi'nde Temmuz 2011-Kasım 2012 yıllarını kapsayan 17 aylık bir sürede kan donörü olarak kabul edilen gönüllülerden, donör olarak onaylanan toplam 1784 kişiden (yaş ortalaması: 34.7 ± 9.6 yıl; %97.3'ü erkek), bilgilendirilmiş onam alınmasının ardından elde edilen serum örnekleri, çalışmada değerlendirilmiştir. Katılımcılardan, vektörlere maruziyet riskinin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan anket formunu doldurmasını istenmiştir. SFSV, SFNV, SFCV ve TOSV'a karşı

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Koray Ergünay, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Ünitesi, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 305 1465, **E-posta (E-mail):** ekoray@hacettepe.edu.tr

IgG antikorlarının taranması amacıyla ticari bir indirekt immüno Floresan testi (IIFT) (Sandfly Fever Virus IgG Mosaic I; Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır. Tarama testlerinde TOSV açısından tek başına ya da SFNV ile birlikte pozitif/yüksek pozitif olarak izlenen örnekler, TOSV virus nötralizasyon testi (VNT) ile, özgüllüğün doğrulanması amacıyla değerlendirilmiştir. Örneklerin %66.8'inde (1192/1784) flebovirus serotiplerinden herhangi birine karşı IIFT pozitifliği saptanmıştır. İncelenen popülasyonda SFSV, SFNV, TOSV ve SFCV seroreaktivitesi sırasıyla; %51.6 (920/1784), %46.4 (827/1784), %43.7 (779/1784) ve %47.3 (843/1784) olarak izlenmiştir. Pozitif örneklerin %6.6'sı (79/1192) tek bir virus serotipine karşı iken, %39.8'inde (475/1192) incelenen tüm serotiplere karşı pozitiflik gözlenmiştir. Toplam 187 örnek TOSV VNT ile incelenmiş ve %13.9'u pozitif olarak bulunmuştur. IIFT bulgularına göre kırsal bölgede yaşama, tüm virus serotiplerine maruziyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olarak izlenmiştir (p değeri, SFSV, SFNV, TOSV ve SFCV için sırasıyla; 0.002, 0.001, <0.001 ve 0.003). Evcil ya da çiftlik hayvanları ile beraber yaşama ise TOSV maruziyeti açısından riskli olarak izlenmiştir (p= 0.005). Sonuç olarak, Mersin ili ve çevresinde yaşayan sağlıklı erişkinlerde, TOSV nötralizan antikorları ile SFSV/SFNV ya da antijenik olarak benzerlik gösteren fleboviruslara yaygın maruziyet saptanmıştır. Bölgede vektör kum sineklerinin aktif olduğu dönemlerde, ortaya çıkacak nedeni bilinmeyen ateşli hastalık ve viral merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında, TOSV ve fleboviruslara yönelik tanısal yaklaşımlar uygulanmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Toscana virus; flebovirus; surveians; seroprevalans; epidemiyoloji.*

ABSTRACT

Phleboviruses are enveloped segmented RNA viruses, capable of inducing febrile disease and/or meningoencephalitis in exposed individuals, according to the infecting strain, following transmission via arthropods. Prototype medically-important phlebovirus strains responsible for sandfly fever are sandfly fever Sicilian virus (SFSV) and sandfly fever Naples virus (SFNV), where the SFSV variant sandfly fever Cyprus virus (SFCV) is also detected in individuals with febrile disease. Toscana virus (TOSV) is unique among phleboviruses as the cause of infections involving central nervous system. In this seroepidemiological study, human exposure to selected medically-important phleboviruses was investigated in healthy adult residents of the Mersin province, Mediterranean Anatolia, Turkey, where the current data on phlebovirus epidemiology is scarce. A total of 1784 healthy individuals (mean age: 34.7 ± 9.6 years; 97.3% were male), accepted as blood donors at the Mersin University Center for Health Research and Application Blood Bank were included in the study after informed consent during a seventeen month period between July 2011 to November 2012. All participants were requested to fill out a questionnaire to reveal risk factors for vector exposure. SFSV, SFNV, SFCV and TOSV IgG antibodies in serum were investigated via a commercial indirect immunofluorescence test (IIFT) (Sandfly Fever Virus IgG Mosaic I; Euroimmun, Germany). Sera interpreted as positive or strong positive for TOSV or SFNV+TOSV in IIFT were evaluated via TOSV virus neutralization test (VNT) for specificity confirmation. IIFT seroreactivity for at least one of the tested phleboviruses was present in 66.8% (1192/1784) of the samples. The most frequently-detected phlebovirus strain was SFSV (51.6%; 920/1784), followed by SFNV (46.4%; 827/1784), TOSV (43.7%; 779/1784) and SFCV (47.3%; 843/1784). Among the reactive sera, 6.6% (79/1192) were positive for a single virus serotype, whereas in 39.8% (475/1192) antibodies reacting with all tested virus serotypes were revealed. A total of 187 sera was included in the TOSV VNT and neutralizing antibodies were detected in 13.9%. According to the IIFT reactivity, residing in rural areas was observed as a statistically significant risk factor for exposure in all phleboviruses tested (p values for SFSV, SFNV, TOSV and SFCV were 0.002, 0.001, <0.001 and 0.003, respectively). TOSV exposure is more frequently detected via IIFT in individuals having pets or domestic farm animals around the living quarters (p= 0.005). As a result, frequent exposure to SFSV/SFCV or antigenically similar phlebovirus strains and viruses of the SFNV species were determined in healthy blood donors in Mersin province, located in the Mediterranean region of Turkey. Furthermore, TOSV neutralizing antibodies were detected in selected samples with IIFT reactivity, confirming previous reports suggesting TOSV activity in the region. TOSV and other phleboviruses must be included in the diagnostic work-up in cases with febrile diseases and viral central nervous system infections during the sandfly-active months.

Keywords: *Toscana virus; phlebovirus; surveillance; seroprevalence; epidemiology.*

GİRİŞ

Fleboviruslar, Bunyaviridae ailesi Phlebovirus cinsinde yer alan, zarflı, küresel virion yapısına sahip, büyüklüklerine göre S, M ve L adı verilen 3 segmentli negatif iplikli RNA genomu taşıyan virustur¹. Phlebovirus cinsinde yer alan 100'e yakın virusun bazıları, 19 tür kapsamında sınıflandırılmaktadır. Fleboviruslar, duyarlı konaklara, virusa göre kum sinekleri (tatarcık, yakarca, "sandfly"), sivrisinekler, Culicoides cinsi sinekler ya da keneler olabilen artropod vektörler ile bulaşır¹. Vektörlerde persistan enfeksiyon izlenir; ayrıca virus transovaryal (vertikal) ve horizontal (veneral) yolla da vektör türleri arasında yayılır. Birçok flebovirus için omurgalı konaklar ve/veya rezervuarlar henüz kesin olarak tanımlanmamıştır; bu durum virusun döngüsünde horizontal yolun daha önde olduğunu düşündürür niteliktedir. Geniş coğrafi ve ekolojik bölgelerde saptanabilen flebovirusların varlığı, Avrupa, Asya ve Afrika kıtasında, ayrıca Amerika'da gösterilmiştir. Son yıllarda, muhtemelen küresel ısınma gibi çeşitli faktörlerin de etkisiyle, global flebovirus habitatlarının genişleme gösterdiği rapor edilmektedir².

Flebovirus kaynaklı insan enfeksiyonları arasında en yaygın görüleni, "kum sineği ateşi", "tatarcık humması" ya da "yakarca ateşi" olarak bilinen ateşli hastalıktır. Kum sineği ateşi, özellikle Akdeniz çevresi ülkelerinde, ayrıca Batı, Güney ve Orta Asya'nın belirli kesimlerinde endemik olarak izlenmektedir. Virusa karşı bağışıklığı olmayan kişilerde olgular ve salgınlar halinde izlenen bu enfeksiyon, endemik bölgelere seyahat edenlerde de yaygın izlenen bir etkenidir^{2,3}. Hastalık yüksek ateş, baş ağrısı, fotofobi, yaygın myalji, halsizlik, yorgunluk ve titreme ile seyreder, gastrointestinal sistem yakınmaları eşlik edebilir. Ateşli dönem genellikle kısa olmakla birlikte halsizlik ve yorgunluk haftalarca sürebilir. Hastalık genel olarak sekelsiz olarak iyileşmekle birlikte önemli derecede hastanede yatış ve işgücü kaybına neden olabilir. Kum sineği ateşi tablosundan sıklıkla sorumlu olan fleboviruslar arasında "sandfly fever Sicilian virus (SFSV)" ve "sandfly fever Naples Virus (SFNV)" yer alırken; SFSV varyantları "sandfly fever Cyprus virus (SFCV)" ve "sandfly fever Turkey virus (SFTV)" daha belirgin gastrointestinal bulgular, karaciğer enzim yüksekliği, trombositopeni ve post-enfeksiyöz asteni sendromuna neden olmaktadır^{3,4}. Kum sineği kaynaklı diğer bir flebovirus olan Toskana virus (TOSV) ise, endemik olarak bulunduğu İtalya, Fransa, İspanya ve diğer bazı Akdeniz ülkelerinde izlenen merkezi sinir sistemi (MSS) viral enfeksiyonu etkenlerinden önde gelenler arasında yer alır. Özellikle vektör kum sineklerinin aktivitesiyle ilişkili olarak, bahar-yaz aylarında insidansı artan TOSV enfeksiyonları, genellikle selim seyirli aseptik menenjit ya da meningoensefalit şeklinde izlenir. Bununla birlikte TOSV enfeksiyonlarında, fatalite izlenen ağır ve uzun süreli seyir, kalıcı nörolojik ve nöropsikiyatrik hasarlar da bildirilmektedir^{5,6}.

TOSV ve diğer fleboviral enfeksiyonların tanısı, akut dönemde elde edilen klinik örneklerde viral nükleik asitlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanması, ayrıca virusa karşı oluşan IgM antikorlarının gösterilmesi ile yapılır. Fleboviruslarda immünite suşa özgüdür ve koruyucu nötralizan antikorlar aynı etkenle tekrarlayan karşılaşmalarda koruma sağlar. Ancak farklı flebovirus izolatları arasında, aynı tür kapsamında yer alan virustarda daha belirgin olmak üzere, serolojik çapraz reaksiyonlar izlenir; bu durum klinik tanıda test sonuçlarının değerlendirilmesinde güçlükler neden olmaktadır.

Fleboviruslara özgül serolojik tanının doğrulanmasında altın standart, virus nötralizasyon testi (VNT)'dir^{3,5,6}.

Türkiye, fleboviruslar açısından endemik bir bölgede yer almakta, çeşitli flebovirus izolatlarının vektörü olduğu bilinen kum sinekleri ülkemiz faunasında bulunmaktadır. Bununla birlikte ülkemizde flebovirus enfeksiyonlarına ait veriler görece olarak kısıtlıdır⁷. Özellikle son beş yılda olgu sunumları ve sürveyans verileri, TOSV ve SFTV de dahil olmak üzere, çeşitli fleboviruslara, klinik hastalıkla sonuçlanan ya da sonuçlanmayan maruziyetin sıklıkla ortaya çıktığını göstermektedir⁸. Bu çalışmada, Akdeniz bölgesi kıyısında yer alan bölgemizde çeşitli fleboviruslara maruziyetin serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu ve Örnekler

Çalışmaya alınan serum örnekleri, Temmuz 2011-Kasım 2012 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kan Merkezi'ne kan donörü olarak başvuran sağlıklı gönüllülerden, bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra elde edildi. Çalışma içeriği ve uygulanacak protokoller, klinik dışı araştırmalarda etik uygulamalar açısından Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Başkanlığı tarafından onaylandı (No. 2012/286). Seçilen kişilerde rutin donör tarama testleri (HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve sifiliz) negatifti. Tüm katılımcılardan, vektörlere maruziyet riskinin değerlendirilmesi amacıyla cinsiyet, yaşanan yer (kırsal ya şehir içi), evcil/çiftlik hayvanları ile birlikte yaşama, mesleki ya da diğer nedenlerle dış mekanlarda vakit geçirme özelliklerini ortaya koymaya yönelik anket formunu doldurmaları istendi.

Flebovirus Tarama ve Doğrulama Testleri

Tüm örnekler, sık saptanan fleboviruslara karşı IgG antikorları açısından ticari bir indirekt immünofluoresans testi (IIFT) ile üreticinin önerileri doğrultusunda incelendi (Sandfly Fever Virus IgG Mosaic I; Euroimmun, Almanya). Kullanılan yöntem, SFSV, SFNV, SFCV ve TOSV ile enfekte hücreleri mozaik IIFT formatında içeren ve her etkene karşı antikorların eş zamanlı olarak tespit edilebildiği bir platformdur. Serumlar 1:100 dilüsyonda teste alındı ve sonuçlar floresan mikroskopunda, kontrollere göre floresans yoğunluğu ve denk dilüsyon olarak, sınırdaki (1/100, +), pozitif (1/320; ++), veya yüksek pozitif (1/1000, +++) olarak değerlendirildi.

Tarama testlerinde TOSV açısından tek başına ya da SFNV ile birlikte pozitif/yüksek pozitif olarak izlenen örnekler, diğer flebovirusların dışlanması ve izlenen seroreaktivitenin doğrulanması amacıyla TOSV VNT ile değerlendirildi. TOSV VNT Vero hücreleri (ATCC CCL81) ve standart TOSV genotip A izolatı (ISS.Phl.3) kullanılarak, 1:40 son serum dilüsyonunda önceden tariflendiği şekilde uygulandı ve 37°C'de 96 saatlik inkübasyon sonucu sitopatik etki gözlenerek yorumlandı⁹.

İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolü Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Cinsiyetlere göre yaş ortalamaları arasındaki farklılığı test edebilmek için "Student's t" testi kullanıldı. Ta-

nımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar için "Pearson ki-kare" ve "Fisher exact" testleri kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak sayı ve yüzde değerleri verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada toplam 1784 kan donörüne ait serum örneği incelenmiştir. Katılımcıların yaş ortalaması 34.7 ± 9.6 yıl olup, %97.3'ü erkektir (Tablo I). Erkekler ve kadınlarda yaş ortalamaları sırasıyla 34.6 ± 9.6 ve 36.5 ± 10.5 yıl olarak hesaplanmış ve cinsiyete göre yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmemiştir ($p = 0.175$). Vektör maruziyeti değerlendirme anketleri de toplanmış ve yanıtlar değerlendirilmiştir (Tablo I).

Tarama Testi Sonuçları

Toplam 1192 örnekte (1192/1784, %66.8), herhangi bir flebovirus serotipine karşı IIFT pozitifliği izlenmiştir. Pozitif örneklerin 79'unda (79/1192, %6.6) tek bir virus serotipine karşı IgG izlenirken, 475 örnekte (475/1192, %39.8) incelenen 4 serotipin hepsine karşı pozitiflik gözlenmiş; kalan örneklerde (638/1192, %53.5) ise reaktivite çeşitli serotip kombinasyonları şeklinde ortaya çıkmıştır. İncelenen flebovirus serotiplere karşı IIFT pozitifliği ve dağılımları Tablo II'de görülmektedir.

Elde edilen veriler, viral serotipler açısından değerlendirildiğinde, incelenen popülasyonda SFSV, SFNV, TOSV ve SFCV seroreaktivitesi sırasıyla; %51.6 (920/1784), %46.4 (827/1784), %43.7 (779/1784) ve %47.3 (843/1784) olarak saptanmıştır (Tablo III).

Doğrulama Testi Sonuçları

Toplam 187 örnek TOSV VNT ile incelenmiş; 26 örnek (26/187, %13.9) pozitif olarak izlenirken; kalan örnekler (26/187, %86.1) negatif olarak değerlendirilmiştir. İncelenen örneklerin 12'sinde (12/187, %6.4) IIFT ile sadece TOSV pozitifliği izlenmiş; kalan örneklerde (175/187, %93.6) SFNV+TOSV birlikte pozitif olarak saptanmıştır (Tablo IV).

Tablo I. İncelenen kan donörlerinde çeşitli demografik özellikler ve vektör maruziyeti açısından riskli aktivitelerin dağılımı

		Sayı (%)
Cinsiyet (n= 1705)	Erkek	1659 (97.3)
	Kadın	46 (2.7)
Yaşadığı yer (n= 1753)	Merkez	1047 (59.7)
	Kırsal	706 (40.3)
Mesleki veya diğer nedenlerle dış ortamda bulunma (n= 881)	Var	356 (40.4)
	Yok	525 (59.6)
Evcil veya çiftlik hayvanları ile yaşama (n= 881)	Var	48 (5.4)
	Yok	833 (94.6)

Tablo II. *Flebovirus seroreaktivitesi izlenen örneklerde serotiplere göre dağılım*

	Tek serotip	SFSV + SFCV ¹	SFNV+TOSV ¹	Diğer Kombinasyonlar ²	Tüm serotipler ³	Toplam
SFSV	31	294	52	68	475	920
SFNV	22	42	214	74	475	827
TOSV	17	13	214	60	475	779
SFCV	9	294	7	58	475	843

¹ Antijenik çapraz reaksiyonlar nedeniyle ilgili viruslarla ikili kombinasyonlar ayrıca verilmiştir.
² İlgili serotipe karşı pozitiflik içeren diğer ikili ve üçlü kombinasyonlar.
³ Araştırılan 4 serotipe karşı pozitiflik izlenen örnekler.
SFSV: Sandfly fever Sicilian virus; SFNV: Sandfly fever Naples virus; SFCV: Sandfly fever Cyprus virus; TOSV: Toscana virus.

Tablo III. *İncelenen flebovirus serotiplerine karşı IIFT seroreaktivitesi (n= 1784)*

			Sayı (%)
SFSV	Negatif		864 (48.4)
		+	141 (7.9)
	Pozitif	++	287 (16.1)
		+++	492 (27.6)
SFNV	Negatif		957 (53.6)
		+	133 (7.5)
	Pozitif	++	288 (16.1)
		+++	406 (22.8)
TOSV	Negatif		1005 (56.3)
		+	100 (5.6)
	Pozitif	++	209 (11.7)
		+++	470 (26.3)
SFCV	Negatif		941 (52.7)
		+	112 (6.3)
	Pozitif	++	211 (11.8)
		+++	520 (29.1)
IIFT: İndirekt immüno Floresan testi; SFSV: Sandfly fever Sicilian virus; SFNV: Sandfly fever Naples virus; SFCV: Sandfly fever Cyprus virus; TOSV: Toscana virus.			

Tablo IV. *TOSV VNT testi sonuçlarının IIFT bulgularına göre dağılımı*

TOSV VNT		IIFT	SFNV	TOSV
Pozitif	Negatif		3	-
		+	-	-
	Pozitif	++	6	6
		+++	17	20
Negatif	Negatif		9	-
		+	24	-
	Pozitif	++	49	51
		+++	79	110

IIFT: İndirekt immüno Floresan testi; SFNV: Sandfly fever Naples virus; TOSV: Toscana virus; VNT: Viral nötralizasyon testi.

Tablo V . IIFT sonuçları ile vektör maruziyeti risk faktörlerinin ilişkisi §

	SFSV				TOSV				SFCV			
	Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif	
		p değeri		p değeri		p değeri		p değeri		p değeri		p değeri
Cinsiyet	Kadın	22	0.237	18	28	0.939	26	0.438	22	0.438	24	0.118
	Erkek	939	(0.495)*	640	1019	(0.964)*	1031	(0.213)*	984	(0.213)*	675	(0.270)*
Yaşadığı yer	Merkez	618	0.002	373	674	0.001	694	< 0.001	645	< 0.001	402	0.003
	Kırsal	365	(0.010)*	308	398	(0.003)*	391	(0.001)*	385	(0.001)*	321	(0.012)*
Dış ortamda bulunma	Var	187	0.091	153	203	0.004	207	0.019	194	0.019	162	0.038
	Yok	306	(0.115)*	175	350	(0.009)*	346	(0.063)*	323	(0.063)*	202	(0.101)*
Evcil-çiftlik hayvanı	Var	21	0.080	22	26	0.205	21	0.005	23	0.005	25	0.119
	Yok	472	(0.048)*	306	527	(0.015)*	532	(0.017)*	494	(0.017)*	339	(0.093)*

§ İstatistiksel olarak anlamlı fark gösteren p değerleri kalın puntuyla belirtilmiştir.

* Parantez içinde verilen p değerleri, pozitif sonuçların "+" ve "++/+++" şeklinde tabakalandırılması sonucu elde edilmiştir.

SFSV: Sandfly fever Sicilian virus; SFNV: Sandfly fever Naples virus; SFCV: Sandfly fever Cyprus virus; TOSV: Toscana virus.

Risk Faktörlerin Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen IIFT sonuçları ile vektör maruziyeti aracılığı ile virus pozitifliği için risk faktörlerinin ilişkisi iki aşamalı olarak değerlendirilmiştir. Bunların ilki, IIFT sonuçlarının "negatif-pozitif" şeklinde kümeleneşmesi, ikincisi ise pozitif sonuçların "+" ve "++ ya da +++" şeklinde tabakalandırılması sonucu elde edilmiştir. Buna göre tüm virus serotipleri için kırsal bölgede yaşama, IIFT reaktivitesi için istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olarak ortaya çıkmıştır (Tablo V). Mesleki ya da diğer nedenlerle dış ortamda bulunma durumu, SFNV, TOSV ve SFCV maruziyeti için "negatif-pozitif" şeklinde kümelemeye riskli olarak izlenirken; tabakalandırılmış değerlendirilmede bu ilişki TSOV ve SFCV için bozulmuştur (Tablo V). Yine tabakalandırılmış pozitiflikler için evcil-çiftlik hayvanları ile beraber yaşama durumu SFSV, SFNV ve TOSV için anlamlı şekilde artmış virus maruziyeti ile ilişkili iken; "negatif-pozitif" şeklinde kümelemeye sadece TOSV için bu durum doğrulanabilmektedir (Tablo V). Cinsiyet ve IIFT reaktivitesi arasında herhangi bir anlamlı ilişki izlenmemiştir. TOSV VNT uygulanan örneklerde ise VNT sonuçları ile herhangi bir risk faktörü arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir (Tablo VI).

TARTIŞMA

Endemik bölgede yer alan ve vektör kum sineklerinin yaygın olduğu Türkiye'de, flebovirus enfeksiyonlarının yaygınlığı ve etkisi açısından bilgi birikimi görece olarak kısıtlıdır. Serosürveyans çalışmaları, olgu bazlı taramalar ve vektör taramalarına ek olarak, bölgede bulunan ve insan maruziyeti izlenen virusların saptanması ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde önem taşır^{7,8}. Bu çalışmada, Mersin ili ve çevresinde yaşayan sağlıklı kan donörle-

Tablo VI. TOSV VNT sonuçları ile vektör maruziyeti risk faktörlerinin ilişkisi

		TOSV VNT		p değeri
		Negatif	Pozitif	
Cinsiyet	Kadın	2	0	1.000
	Erkek	153	23	
Yaşadığı yer	Merkez	89	11	0.352
	Kırsal	70	13	
Dış ortamda bulunma	Var	34	8	0.097
	Yok	40	3	
Evcil-çiftlik hayvanı	Var	7	1	1.000
	Yok	67	10	

rinde, kesinleşmiş insan patojeni olan ve yaygın izlenen çeşitli fleboviruslara maruziyet araştırılmıştır. Çalışmada, 2011-2012 yıllarını kapsayan 17 aylık bir sürede, herhangi bir tıbbi şikayeti olmayan ve kan donörü olarak kabul edilen sağlıklı erişkinlerde, SFSV, SFNV, TOSV ve SFCV serotiplerine karşı IgG antikorları, ticari bir IIFT testi ile incelenmiştir. Örneklerin %66.8'inde (1192/1784), herhangi bir virus serotipine karşı antikor saptanmış, pozitif örneklerin %39.8'inde (475/1192) ise her 4 virus serotipi için pozitiflik gösterilmiştir. Mersin bölgesinde daha önceden TOSV harici fleboviruslarla ilgili seroprevalans verisi yoktur ve bu çalışmada saptanan oranlar, virus serotiplerinden bağımsız olarak bölgede dikkate değer bir flebovirus aktivitesine işaret etmektedir. Aynı yöntem (IIFT) ile İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde yapılan bir çalışmada; Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak bölgelerinde pozitiflik oranları sırasıyla, %20.7, %65.9, %21.6 ve %29.6 olarak bildirilmiştir¹⁰. Virus serotipine göre dağılımlar incelendiğinde, en sık olarak %51.6 ile SFSV, ardından SFCV (%47.3), SFNV (%46.4) ve TOSV (%43.7) izlenmiştir. Bununla birlikte, VNT ve ayrıntılı değerlendirmede antijenik benzerlik içeren tüm virusları içeren çapraz VNT testleri uygulanmadan, ortaya çıkan tarama testi seropozitifliğinin belirli bir flebovirus serotipine ait olduğunun kanıtlanması mümkün değildir. Henüz Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Committee for the Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından aynı tür kapsamında sınıflandırılmamış olmasına karşın; SFSV ve onun varyantları kabul edilen SFCV ve ülkemiz kaynaklı SFTV'nin, bu çalışmada kullandığımız yöntem de dahil olmak üzere serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar verdiği bildirilmektedir². Bu nedenle çalışmamızda gözlenen, daha önce de raporlanmış olan, SFSV ve SFCV serotiplerine karşı pozitif reaksiyonların önemli bir bölümünün, izolatlar arası çapraz reaksiyonlara bağlı olduğu söylenebilir. Çalışmamızda izlenen, tekli virus serotiplerinden çok, ortak serogruplarda izlenen ikili ve çoklu IIFT reaktivitesi (SFSC+SFCV ve SFNV+TOSV, Tablo II), bu durumu doğrular niteliktedir. Bununla birlikte, farklı viruslara değişik zamanlarla ardışık maruziyet de, benzer bir serolojik tabloya neden olabilir. Ek olarak bölgede yeni flebovirusların varlığı da ortaya konulmuştur¹¹. Tüm bu nedenlere bağlı olarak, fleboviruslara ait tarama testleri ile alınan seroreaktivitenin yorumlanması güçtür. Bununla birlikte bölgede ateşli hastalık etkeni olan SFSV ve/veya varyantlarının yaygın olarak bulunduğu söylenmelidir. Ülkemiz kaynaklı diğer çalışmalar incelendiğinde, flebovirus aktivitesinin

uzun süredir devam ettiğine işaret eden veriler dikkati çekmektedir. VNT ile doğrulanmış sonuçlar göz önüne alındığında; Antalya bölgesinde yaşayan asemptomatik 50 erişkinde 1955 yılında toplanmış örneklerde SFSV ve SFNV antikorları sırasıyla %22 ve %62 oranlarında saptanmıştır¹². Ege bölgesinden ise 1980 yılında SFSV için %0.84, SFNV için %13.9 oranında seropozitiflik bildirilmiştir¹³. Aydın iline bağlı Akbük ve Olukbaşı bölgelerinde 2002 yılında yapılan bir çalışmada da SFSN ve TOSV maruziyeti rapor edilmiştir¹⁴.

Kanıtlanmış nörovirölansı ve endemik bölgelerde önemli bir aseptik meningoensefalit etkeni olarak izlenmesi ile TOSV, diğer fleboviruslardan farklılık gösterir⁵. Ülkemizde MSS tutulumu izlenen ilk TOSV olguları 2010 yılında saptanmış, takip eden çalışmalarda asemptomatik popülasyonlarda da seropozitiflik gösterilmiştir^{10,14,15}. Çalışmamızda IIFT yöntemiyle incelenen asemptomatik kan donörlerinin %43.7'ünde TOSV IgG antikorları saptanmıştır. TOSV güncel sınıflandırma kapsamında, SFNV ve diğer çeşitli flebovirus serotipleri ile SFNV serokompleksi dahilinde incelenmekte ve bu serokompleks içindeki viruslar arasında antijenik çapraz reaksiyonlar bilinmektedir¹. Bu nedenle TOSV VNT, elde edilen seroreaktif örneklerde özgüllüğün doğrulanması amacıyla çalışmamızda uygulanmış ve tüm TOSV pozitif örneklerin VNT ile incelenmesi planlanmıştır. Bununla birlikte örnek sayısının yüksekliği (779, Tablo II) nedeniyle, sadece TOSV ya da muhtemel çapraz reaksiyonlar göz önüne alınarak TOSV + SFNV açısından pozitif ya da yüksek pozitif (++)/+++ olarak izlenen kişilerden, testin uygulaması ve tekrarları için yeterli miktarda örnek elde olanlar incelenebilmiştir. Toplam olarak 187 örneğin değerlendirildiği TOSV VNT'de %13.9 oranında pozitiflik izlenmiştir. Ülkemizde TOSV maruziyetine dair ilk bulgu, yukarıda belirtildiği gibi 2002 yılı Ege bölgesi kaynaklıdır¹⁴. TOSV olgularının tanımlandığı çalışmada da, Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak illerinde yaşayan kişilerde nötralizan antikorlar gösterilmiştir¹⁰. TOSV epidemiyolojisi konusunda ayrıntılı bir serosürveyans çalışmasında ise, Ankara ve Eskişehir illerinde %5.2 oranında nötralizan antikor varlığı gösterilmiş, ayrıca İç Anadolu bölgesinde Kırıkkale, Çorum ve Kayseri illeri, Karadeniz bölgesinden Kastamonu ve Samsun illeri, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden Mardin, Van, Gaziantep, Urfa, Adıyaman ve Diyarbakır illerinde yaşayan kişilerde maruziyet doğrulanmıştır¹⁵. Aynı çalışmada Akdeniz bölgesinden Antalya, Hatay ve Mersin illerinden de seropozitif kişiler izlenmiş; ancak olgu sayılarının görece düşük olması nedeniyle bölgesel virus aktivitesi konusunda net yorum yapılamamıştır. Çalışmamızda bu ön bulgular doğrulanmış, Mersin ili ve çevresinde yaşayan kişilerde TOSV maruziyeti kesin olarak saptanmıştır. Tüm serotiplere karşı izlenen IIFT pozitif örnekler (Tablo II) ve çeşitli nedenlerle TOSV VNT ile değerlendirme dışı bırakılan örnekler göz önüne alındığında, bölgedeki TOSV seroprevalansının daha yüksek olduğu spekülasyonu yapılabilir. Diğer fleboviruslar gibi TOSV'un da, vektörlerin aktif olmadığı sonbahar ve kış aylarında aktivitesini sürdürmesi için kullandığı mekanizmalar açık değildir. Kum sineklerinde saptanan vertikal ve horizontal virus geçişi yoluyla yeni bireylerin enfeksiyonu, muhtemelen bölgede virus devamlılığının sağlanmasında etkilidir. Bununla birlikte memeliler ya da diğer hayvanların rezervuar olarak rolü henüz açık değildir^{5,6}. Mersin ve Adana bölgelerini kapsayan bir çalışmada, incelenen köpek, kedi, koyun ve keçi örneklerinde TOSV IgG ve viral RNA araştırılmış; köpek ve keçi örneklerinin sırasıyla %40.4 ve %4'ünde nötralizan antikorlar saptanmıştır¹⁶. Ayrıca ağırlıklı olarak köpek örneklerinde

viral RNA pozitifliği saptanarak, daha önceden varlığı gösterilen genotip A izolatlarının yanı sıra, genotip B izolatlarının da bölgede bulunduğu rapor edilmiştir¹⁶. Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen ve bölgede süregelen bir TOSV aktivitesine işaret eden verileri desteklemektedir. Bölgede izlenecek etiyolojisi belirlenemeyen ateşli hastalık ve viral meningoensefalit olgularında, özellikle vektörlerin yoğun olarak aktivite gösterdiği bahar ve yaz aylarında TOSV, ayırıcı tanıda mutlaka değerlendirilmelidir. Türkiye adresli güncel raporlarda, çeşitli bölgelerde TOSV aktivitesinin devam ettiği, tanısı doğrulanmış ya da muhtemel çeşitli olgu serileri ile gösterilmektedir^{17,18}. Güncel olarak Tekirdağ ili ve çevresinde olgular rapor edilmiş ve bölgede yaşayan kişilerde %14.4 oranında özgül antikor varlığı saptanmıştır¹⁹.

Flebovirus enfeksiyonları açısından, vektör kum sinekleri ile maruziyet olasılığını artıran çeşitli durumlar, genel olarak risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. TOSV ve diğer flebovirusların endemik olarak bulunmadığı ülkelerde yaşayan kişiler için en önemli faktör, endemik bölgeye seyahat öyküsüdür. Endemik bölgelerde ise mesleki nedenlerle günlük zamanının önemli bir bölümünü dış ortamda geçirme, kırsal bölgede ikamet, çevrede virusla enfekte ya da vektör olarak kompetans gösteren kum sineklerin varlığı ve çeşitli nedenlerle artmış vektör maruziyeti, enfeksiyon risklerini artırmaktadır². İç Anadolu bölgesinde gerçekleştirilen TOSV serosürveyansı verileri; erkek cinsiyet, kırsal bölgede yaşama, çevrede sık olarak sivrisinek ya da kum sineği görülmesi ve dış ortamda çalışma özelliklerinin, TOSV IgG pozitifliği ile korelasyon gösterdiğini vurgulamaktadır¹⁵. Ayrıca özgül antikor seroprevalansı yaşla ilişkili olarak artmaktadır. Tanımlanan bu epidemiyolojik özellikler, TOSV için endemik diğer ülkelerde izlenenlere benzerlik göstermektedir^{5,6}. Çalışmamızda kan donörlerinde değerlendirilen cinsiyet, il merkezi ya da kırsal bölgede ikamet, mesleki veya diğer nedenlerle dış ortamda bulunma ve evcil veya çiftlik hayvanları ile yaşama durumları ile TOSV nötralizan antikor varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Tablo VI). Ancak IIFT bulguları, farklı değerlendirme kategorileri de göz önüne alınarak incelendiğinde; kırsal bölgede yaşama, tüm virus serotiplerine karşı IIFT pozitifliği açısından anlamlı bir risk faktörü olarak izlenmiştir (Tablo V). Evcil veya çiftlik hayvanları ile beraber yaşama, TOSV maruziyeti açısından riskli olarak izlenirken, sonuçların farklı şekilde gruplandırılması ile SFSV ve SFNV için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Benzer gözlemler, mesleki ya da diğer nedenlerle dış ortamda bulunma durumu için de geçerlidir (Tablo V). Bu durum, tüm örneklerin özgüllüğünün altın standart yöntemle doğrulanamadığı ve görece subjektif olarak değerlendirilen IIFT testi için kabul edilebilir düzeydedir. Bununla birlikte, çeşitli flebovirus serokomplekslerine ait virus izolatları açısından incelenen tüm durumların, artmış maruziyet ile ilişkili olduğu söylenmelidir. TOSV VNT uygulanan örneklerde bu ilişkinin gösterilememiş olması, yüksek olasılıkla teste alınan örneklerin seçimine bağlı olarak ortaya çıkmıştır. İç Anadolu bölgesi kaynaklı verilerin aksine, cinsiyet ve virus maruziyeti açısından anlamlı bir ilişki görülmemesi, iki bölge ya da örneklem arasında sosyokültürel ya da diğer farklılıkları yansıtır olabilir.

Sonuç olarak, Mersin ilinde yaşayan sağlıklı kan donörlerinde gerçekleştirilen IgG serosürveyansında, TOSV nötralizan antikorları ile SFSV/SFNV ya da antijenik olarak benzerlik gösteren fleboviruslara yaygın maruziyet saptanmıştır. Bölgede vektör kum sineklerinin

aktif olduğu dönemlerde ortaya çıkacak nedeni bilinmeyen ateşli hastalık ve viral MSS enfeksiyonlarında, TOSV ve fleboviruslara yönelik tanısal yaklaşımlar uygulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Plyusnin A, Beaty BJ, Elliott RM, et al. Bunyaviridae, pp: 725-41. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds), Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012, 1st ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
2. Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, Alten B, Gould EA, Charrel RN. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res* 2013; 100(1): 54-74.
3. Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, Valassina M. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(5): 383-8.
4. Kocak Tufan Z, Weidmann M, Bulut C, et al. Clinical and laboratory findings of a sandfly fever Turkey virus outbreak in Ankara. *J Infect* 2011; 63(5): 375-81.
5. Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World J Virol* 2012; 1(5): 135-41.
6. Charrel RN. Toscana virus infection, pp: 112-3. In: Ergönül Ö, Can F, Madoff L, Akova M (eds), *Emerging Infectious Diseases: clinical case studies*. 2014, 1st ed. Elsevier Academic Press, New York, NY.
7. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of hu-man arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(6): 731-41.
8. Ergünay K, Koçak Tufan Z. Overview of West Nile virus and sandfly-borne phlebovirus infections in Anatolia. *J Microbiol Infect Dis* 2014; Special Issue 1: S22-S31.
9. Ergünay K, Litzba N, Lo MM, et al. Performance of various commercial assays for the detection of Toscana virus antibodies. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(6): 781-7.
10. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, et al. Sandfly fever virus activity in central/northern Anatolia, Turkey: first report of Toscana virus infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4): 575-81.
11. Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, et al. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J Virol* 2015; 89(8): 4080-91.
12. Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjaj-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 1976; 54(6): 663-74.
13. Serter D. Present status of arbovirus seroepidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zbl Bakt* 1980; S9: 155-61.
14. Ozbel Y, Ertabaklar H, Ciufolini MG, et al. Sandfly fever viruses (Phleboviruses) transmitted by phlebotomus in Turkey. 3rd Balkan Conference of Microbiology, Istanbul, Sep 4-6, 2003. *Proceedings Book*, p. 152-5.
15. Ergunay K, Aydogan S, Ilhami Ozcebe O, et al. Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* 2012; 59(2): 148-54.
16. Dincer E, Gargari S, Ozkul A, Ergunay K. Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92(4): 690-7.
17. Kuşcu F, Menemenlioğlu D, Öztürk DB, Korukluoğlu G, Uyar Y. Acute Toscana virus infection in an anti-HIV positive patient. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 168-73.
18. Ocal M, Orsten S, Inkaya AC, et al. Ongoing activity of Toscana virus genotype A and West Nile virus lineage 1 strains in Turkey: a clinical and field survey. *Zoonoses Public Health* 2014; 61(7): 480-91.
19. Erdem H, Ergunay K, Yılmaz 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.