

Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu İllerindeki Yabani Kemiricilerde Hantavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Taranması

Ceylan POLAT*, Ferhat MATUR**, Mustafa SÖZEN***, Mehmet Ali ÖKTEM*

*Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

***Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak

ÖZ

Amaç: Hantavirüsler, enfekte kemirici ve bazı böcekçilere ait sekresyonlardaki viral partiküllerin solunması yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) etkeni olan Hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türleri ülkemizde de yayılım göstermektedir. Hantavirüs enfeksiyonlarında grip benzeri bulguların görülmesi ve hastalığın hızla ilerlemesi, erken tanı konulmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle saha çalışmaları ile alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülerek, bölgedeki halk ve yetkili kişiler önceden uyarılabilmektedir. Bu çalışmada, saha araştırması ile bölge taraması yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan *Apodemus spp.*, *Microtus spp.* ve *Mus spp.* türlerinden 193 kemiriciye ait serum örnekleri serolojik olarak tarandı.

Bulgular: Bu kemiricilerde Hantavirüse özgül antikor varlığı saptanmadı.

Sonuç: Türkiye'de Hantavirüs açısından taranmamış pek çok bölge bulunmaktadır. Yapılacak yeni çalışmalar ile diğer bölgelerde Hantavirüs prevalansının ve bölgelerin risk durumunun belirlenmesi önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Hantavirüs, kemirici, seroloji

ABSTRACT

The Serological Screening of Wild Rodents for Hantavirus Infections in the Middle and Southern Anatolia Region of Turkey

Objective: Hantaviruses infect humans via inhalation of the viral particles in the secretions of some rodents and insectivores. The rodent species which known as reservoirs of Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) and Seoul (SEOV) viruses of Hantavirüs subtypes which cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) are also found in Turkey. Early diagnosis of Hantavirus infections is difficult, because of the flu-like symptoms and rapid progression of the disease. However, the prevalence of hantavirus seropositivity in rodents from the field works could predict and warn authorities for possible human outbreaks. In this study field research and regional screening were aimed.

Material and Methods: In the present study serum samples of 193 rodents of *Apodemus spp.*, *Microtus spp.* and *Mus spp.* collected from Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay Provinces were screened using serological methods.

Results: The presence of antibody against Hantaviruses were not detected in these rodents.

Conclusion: There are a large number of geographical areas in Turkey that have not screened for hantaviruses. Determination of Hantavirus prevalence and the risk status of other regions in further studies to be performed conveys importance.

Keywords: Hantavirus, rodent, serology

GİRİŞ

Hantavirüs cinsi, *Bunyaviridae* ailesindeki beş

cinsten biri olup, "International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)" 2015 yılı verilerine göre 24 tür içermektedir. Hantavirüsler, tek

Alındığı tarih: 19.01.2017

Kabul tarihi: 04.03.2017

Yazışma adresi: Ceylan Polat, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

e-posta: ceylanpolat88@gmail.com

iplikli, negatif polariteli, üç segmentli genoma sahip zarflı RNA virüsleridir. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) gibi klinik tablolar oluşturması nedeniyle tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hantavirüsler, kemiriciler ve bazı böcekçiller ile taşınmaktadır⁽¹⁾. İnsanlara bulaş, enfekte kemirici ve böcekçillere ait sekresyonlardaki (dışkı, idrar, tükürük vb.) viral partiküllerin solunması yolu ile gerçekleşmektedir⁽¹⁾. Her bir hantavirüs tipi, belli bir kemirici türü ile taşındığından, etkenlerin yayılım alanları da bu kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı kalmaktadır⁽¹⁾. Bu nedenle RSKA olguları Avrasya'da görülürken, HPS olguları Amerika'da görülmektedir⁽²⁾.

RSKA etkeni olan hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türlerinden *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* ülkemizde de yayılım göstermektedir⁽³⁻⁶⁾. Şimdiye kadar hem RSKA şüphesi olan hastalara ait serum örnekleri ile hem de kemiricilere ait doku ve serum örnekleri ile yapılan çalışmalarda, Hantavirüs enfeksiyonları gösterilmiştir⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Hantavirüs enfeksiyonlarında, enfeksiyona neden olan hantavirüs tipine bağlı olarak, yüksek mortalite oranları görülebilmektedir. Bu nedenle erken tanı koyulması önem taşımaktadır. Ancak hastalığın grip benzeri bulgular vermesi, erken dönemde tanı koyulmasını güçleştirmektedir. Ayrıca virüse karşı doğrudan etkili bir antiviral ajan da bulunmadığından enfeksiyondan korunma daha da önem kazanmaktadır. Yapılan saha çalışmaları ile yaban yaşamındaki kemirici populasyonlarında enfeksiyonun takibi sağlanmakta, alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülebilmektedir. Ancak kemiricilere ait örneklerin

DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından serolojik olarak taranmasında kullanılacak bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle insan serumlarının taranması için üretilmiş, ticari enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ve immunoblot testleri, Polat ve ark.^(11,12) tarafından kemirici örneklerinde hantavirüse özgül antikorların taranmasına uygun olarak optimize edilmiştir.

Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan, farklı türlerden 193 kemiriciye ait serum örnekleri, optimize edilen ELISA testi ile^(11,12) taranmış ve immunoblot testi ile ülkemizde de görülen PUUV, DOBV ve Asya'da RSKA olgularına neden olan Hantaan virüse (HTNV) özgül antikor varlığı açısından değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (19.08.2014 tarih ve 15/2014 no'lu karar) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Örnekler: Kemiriciler, hayvanları canlı olarak yakalamayı sağlayan "Sherman" tipi kapan tuzaklar ile 2015-2016 yıllarında Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin ve Hatay illerinde yapılan arazi çalışmaları sırasında toplandı. Kemiricilerin tür tayinleri, arazi çalışmaları sırasında fenotipik olarak yapıldı. Çalışma sırasında kemiricilerin serum örnekleri kullanıldı. Pozitif (DOBV ve PUUV) ve negatif kontrol olarak kullanılan kemirici serum örnekleri, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edildi.

Kemirici Serumlarının ELISA ile Taranması: Hantavirüse karşı antikor varlığının belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı ELISA plakları

(Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Örnekler, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen prosedür uygulanarak tarandı.

Her bir kuyucuğa 100 µL 1/50 oranında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltilen serum örneği eklendi ve her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra boşaltılan kuyucuklar, deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Yıkama sırasında her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30 saniye hafifçe çalkalandı. Yıkama sonrasında boşaltılan kuyucuklara, 100 µL 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore, ABD) eklendi. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra yukarıda anlatılan şekilde yine yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklendi. Örneklerin optik dansiteleri (OD), 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

Kemirici Serumlarının İmmunoblot ile Doğrulanması: Hantavirüse karşı antikor varlığının doğrulanması için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş immunoblot şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. ELISA sonuçları, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen immunoblot prosedürü uygulanarak doğrulandı. İmmunoblot şeritleri, inkübasyon tepsisine yerleştirilip, 1.5 ml bloklama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında inkübasyon tepsisinde bulunan sıvı aspire edildikten sonra, her bir örneğe ait şerit üzerine 1.5

ml 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen kemirici serumu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Serum örnekleri aspire edildikten sonra üçer kez beşer dakika 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında 1.5 ml 1/5.000 oranında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yukarıda anlatılan şekilde yeniden yıkama yapıldı. Her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı. İmmunoblot şeritleri üzerindeki bant yoğunlukları, şeritler kuruduktan sonra değerlendirildi.

BULGULAR

Yakalanan Kemiriciler: Çalışma sırasında yakalanan 193 kemiriciden 89'u *Apodemus* spp. (%46.1), 55'i *Microtus* spp. (%28.5) ve 49'u *Mus* spp. (%25.4) olarak belirlendi.

Kemirici Serumlarının Serolojik Test Sonuçları: Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından optimize edilen prosedüre göre OD değeri 0.326 ve üzerinde olan örnekler, pozitif olarak değerlendirildi. Sekiz ilden toplanan 193 kemiriciden 33'ünde (%17.1) hantavirüs açısından düşük seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptandı. Bu kemiricilerden 18'i (% 54.5) *Mus* spp. ve 15'i (%45.5) *Apodemus* spp. türlerindendi.

Seropozitif olarak belirlenen kemiricilere ait serum örneklerinin tümü, immunoblot testi ile negatif olarak saptandı.

TARTIŞMA

Hantavirüs enfeksiyonları, enfekte kemirici ve böcekçillerin sekresyonlarındaki viral partiküllerin solunması ile insanlara bulaşmaktadır. Kemiricilerde kronik bir enfeksiyona neden olan virüs, viral partikülleri içeren sekresyonlar ile ömür boyu çevreye saçılırken, enfekte kişilerde akut enfeksiyon sonucunda RSKA ve HPS gibi mortalitesi yüksek klinik tablolara neden olabilmektedir. Bu nedenle Hantavirüs enfeksiyonlarından korunabilmek için, alandaki Hantavirüs prevalansının ve olası salgın bölgelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır⁽¹⁾.

Hantavirüslerin Türkiye'deki yaban yaşamı kemiricilerindeki varlığı ilk kez 2004 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir⁽⁷⁾. Türkiye'deki ilk Hantavirüs salgını ise 2009 yılında Batı Karadeniz bölgesindeki RSKA olgular ile bildirilmiştir^(8,9). Bu salgının ardından aynı bölgede gerçekleştirilen saha çalışmaları ile Türkiye'deki kemiricilerde ilk kez PUUV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DOBV varlığı gösterilmiştir⁽¹⁰⁾.

Kemiricilerin serolojik olarak taranabilmesini sağlayacak testlerin varlığı, saha çalışmaları sırasında yakalanan kemiricilerin hızlıca taranarak, birkaç saat içerisinde sonuç alınmasını ve elde edilen veriler ışığında saha çalışmasının yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından kemiricilerin serolojik olarak taranmasında kullanılabilecek bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle, Polat ve ark.^(11,12) tarafından insan serumlarında Hantavirüse özgül antikor varlığının araştırılması amacıyla üretilmiş, ticari ELISA ve immunoblot testleri (Euroimmun, Almanya), kemirici örneklerinin taranabilmesi için optimize edilmiştir. Bu çalışmada da, kemirici serumlarının taranması için optimize edilmiş olan ELISA ve immunoblot yöntemleri

uygulanmıştır⁽¹²⁾.

Serolojik taraması yapılan 193 kemiricide hantavirüs antikor varlığı saptanamamıştır. Pozitif kontrol örneklerinde saptanan OD değerleri 1.000 ve üzerinde olduğundan, eşik OD değeri 0.326 olan ELISA testi ile 33 kemiricide (33/193) düşük düzeyde seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptanmıştır. Ancak immunoblot yöntemi ile doğrulanamamıştır. Bunun nedeni, ELISA için belirlenen eşik değerinin taraması yapılan kemirici türleri için düşük kalmış olabileceğidir. Bu yüzden örnekler, yalnızca ELISA testi sonucuna göre negatif ya da pozitif olarak değerlendirilmemiş, altın standart olarak kabul edilen immunoblot testi de dikkate alınmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen kemiricilerin bir kısmının yakalandığı illerden olan Konya, Aksaray ve Hatay'dan RSKA olguları bildirilmiştir. Ancak bu illerden yakalanan kemiricilerde seropozitiflik saptanamamıştır. Bunun nedeni, hastaların başka illerde enfekte olduktan sonra Konya, Aksaray ve Hatay'daki hastanelere başvurmuş olmaları ya da örneklem alanının hastaların yaşadığı bölgeden farklı bir alan olması olabilir.

Türkiye'nin pek çok ilinde henüz Hantavirüs açısından saha çalışması yapılmamıştır. Güncel durum bilgisine sahip olmadan ve olguların görülebileceği riskli bölgeler belirlenmeden, Hantavirüs enfeksiyonlarından korunmanın sağlanabilmesi olası değildir. Bu nedenle, henüz tarama yapılmamış alanlarda da saha çalışmaları planlanması önem taşımaktadır.

Teşekkür

Çalışmada serolojik taramalarda laboratuvar işlemlerine katkıda bulunan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğrencisi Mert

Erdin'e teşekkürlerimizi sunarız. Bu çalışma, Tübitak 1001 Araştırma Destek Programı tarafından desteklenen SBAG214S276 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O.** Hantavirus infections Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol* 2013; 23:35-49.
<https://doi.org/10.1002/rmv.1722>
2. **Jonsson CB, Figueriedo LT, Vapalahti O.** A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:412-41.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
3. **Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ.** The taxonomy and distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey. *Turk J Zool* 2003; 27:141-6.
4. **Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A.** Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Ankara: Meteksan Yayınevi, 2006.
5. **Krystufek B, Vohralik V.** Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. *Zool Middle East* 2007; 42:25-36.
<https://doi.org/10.1080/09397140.2007.10638243>
6. **Krystufek B, Vohralik V.** Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Slovenya: Koper, 2009.
7. **Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al.** Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis* 2006; 42:672-6.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.3.672>
8. **Ertek M, Buzgan T.** An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:pii:19214.
9. **Celebi G, Piskin N, Öktem MA, ve ark.** Bir salgının anatomisi. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı; 25-29 Mart 2009; Antalya: Türkiye, 2009:163.
10. **Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, et al.** Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:121-5.
<https://doi.org/10.3201/eid2001.121024>
11. **Polat C, Oktem MA, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoğlu H.** Optimization of a commercial Hantavirus IgG enzyme immunoassay for human use to screen infection among wild rodents in Kırklareli, Turkey. "5th European Congress of Virology" Kongresi Kitabı; 11-14 Eylül 2013; Lyon: Fransa, 2013:193.
12. **Polat C, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoğlu H, Öktem MA.** Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirüs IgG antikorlarının saptanması için ELISA ve immunoblot yöntemlerinin optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:245-55.
<https://doi.org/10.5578/mb.23161>