

Yabani Kemiricilerde Eski Dünya Hantavirus IgG Antikorlarının Saptanması için ELISA ve İmmüno blot Yöntemlerinin Optimizasyonu*

Optimization of ELISA and Immunoblot Methods for the Detection of IgG Antibodies Against Old World Hantaviruses in Wild Rodents

Ceylan POLAT¹, Ahmet KARATAŞ², Mustafa SÖZEN³, Ferhat MATUR³, Hakan ABACIOĞLU⁴, Mehmet Ali ÖKTEM¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

² Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Niğde.

² Niğde University Faculty of Arts&Sciences, Department of Biology, Niğde, Turkey.

³ Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak.

³ Bülent Ecevit University Faculty of Arts&Sciences, Department of Biology, Zonguldak, Turkey.

⁴ İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ İzmir University of Economics, School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

*Bu çalışma, 5th European Virology Congress (11-14 Eylül 2013, Lyon, Fransa)'de poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 15.01.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.03.2016

ÖZ

Hantaviruslar, enfekte kemiricilerin salya, dışkı ve idrar gibi salgılarında bulunan virus partiküllerinin solunması ya da enfekte kemiricilerle direkt temas sonucu insanlara bulaşmaktadır. Ülkemizde, hantavirus tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) viruslarının taşıyıcısı olan kemirici türleri bulunmaktadır. Türkiye'deki kemiricilerde hantaviruslara özgül antikor varlığı, ilk kez 2004 yılında Karadeniz ve Ege bölgelerinden toplanan kemiricilerde gösterilmiştir. İlk renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) olguları ise 2009 yılında yine Karadeniz bölgesinden bildirilmiştir. Yaban hayatı ve sahadaki kemirici popülasyonlarında hantavirus prevalansının önceden belirlenmesi, hantaviruslara bağlı olguların durumu hakkında bilgi edinilmesi ve sahadaki risk durumunun ortaya konması açısından önem taşımaktadır. Kemiricilere ait örneklerin, DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen ve ülkemizde de görüldüğü bilinen bazı RSKA etkenleri açısından taranmasında kullanılabilecek şekilde optimize edilmiş bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu çalışmada, insan serumlarının taranması için üretilmiş, ticari enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ve immüno blot testlerine ait antijenler

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Mehmet Ali Öktem, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340 Narlıdere, İzmir, Türkiye. Tel (Phone): +90 232 412 4501, E-posta (E-mail): ali.oktem@deu.edu.tr

kullanılarak, kemirici örneklerinde hantavirusa özgül antikorların taranmasına uygun testlerin optimizasyonu sağlanmıştır. ELISA (Anti-Hantavirus Pool ELISA; Euroimmun, Almanya) ve immünoblot (Euroline Anti-Hanta Profile 1 strips; Euroimmun, Almanya) yöntemlerinin optimizasyonu için, en uygun serum ve konjugat dilüsyonları denenmiş ve ELISA yöntemi tarama, immünoblot yöntemi ise doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Belirlenen bu prosedür ile, *Apodemus* ve *Microtus* türlerinden 84 kemiriciye ait serum örnekleri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar ile optimize edilen ELISA yönteminin eşik değeri, duyarlılık ve özgüllüğü saptanmıştır. ELISA yönteminin optimizasyonu için 1/50, 1/100 ve 1/200 serum dilüsyonları ile 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000 konjugat dilüsyonları; immünoblot yönteminin optimizasyonu için ise 1/50 ve 1/100 serum dilüsyonları ile 1/5.000 ve 1/10.000 konjugat dilüsyonları değerlendirilmiştir. ELISA için "horseradish" peroksidaz enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı, immünoblot için ise alkalin fosfataz ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı kullanılmıştır. İnkübasyon süresi, yıkama sayısı ve substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulanmıştır. ELISA yöntemi için 1/50 serum dilüsyonu ve 1/10.000 konjugat dilüsyonu, immünoblot için ise 1/100 serum dilüsyonu ve 1/5.000 konjugat dilüsyonu optimal değerler olarak belirlenmiştir. Optimize edilen ELISA yöntemiyle, belirlenen eşik değerine ($OD_{450/620}$: 0.325) göre, kemiricilerin %26.2'sinde (22/84) hantavirusa karşı antikor varlığı saptanmıştır. Doğrulama amacıyla kullanılan optimize immünoblot yöntemiyle ise, ELISA ile pozitif bulunan 22 örneğin -serum yetersizliği nedeniyle- 20'si çalışılmış ve 17'sinde DOBV antikor pozitifliği saptanmıştır. Bu kemiricilerden 11'i *Apodemus flavicollis*, üçü *Apodemus agrarius*, ikisi *Microtus guentheri* ve biri de *Apodemus sylvaticus* türlerine aittir. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, optimize ELISA yönteminin %100 duyarlılık ve %95 özgüllükte olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile kemirici serumlarının taranmasında kullanılabilecek, kolaylıkla ulaşılabilen ticari ürünlerden elde edilen antijenlerin kullanıldığı, hızlı ve güvenilir sonuç veren bir yöntem oluşturulmuştur. Benzer çalışmalar ile farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilecek serolojik yöntemler, alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Hantavirus; kemirici; seroloji; optimizasyon.

ABSTRACT

Hantaviruses infect humans via inhalation of viral particles in infected rodents' secretions such as saliva, urine and faeces or via direct contact with infected rodents. The rodent species that are known as the carriers of Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) and Seoul (SEOV) viruses are found in our country. The presence of specific antibodies against hantaviruses have been demonstrated in rodents collected from Black Sea and Aegean Regions of Turkey in 2004 for the first time. The first hantavirus-related hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) cases were reported in Black Sea region in 2009. The determination of the hantavirus prevalence in wild life and rodent populations in the field is crucial for the information about hantavirus-related cases and to clarify the state of risk. There is no commercial product optimized for the screening of rodent serum samples in terms of HFRS agents like DOBV and PUUV that are widely seen in Eurasia as well as Turkey. In this study, the antigens belonging to the commercial enzyme-linked immunoassay (ELISA) and immunoblot tests that are produced for the screening of human sera were used for the development of antibody screening tests against hantavirus in rodent sera and were optimized. The most appropriate serum and conjugate dilutions were determined for the optimization of ELISA (Anti-Hantavirus Pool ELISA; Euroimmun, Germany) and immunoblot (Euroline Anti-Hanta Profile 1 strips; Euroimmun, Germany) methods. Optimized ELISA method was used for the screening and optimized immunoblot method was used for the confirmation. A total of 84 wild rodent sera that belonged to *Apodemus* and *Microtus* species were evaluated with this procedure and the cut-off value, sensitivity and specificity of optimized ELISA method were determined. For the optimization of ELISA 1/50, 1/100 and 1/200 serum dilutions and 1/10.000, 1/20.000 and 1/40.000 conjugate dilutions were tested. For the optimization of immunoblot, 1/50 and 1/100 serum dilutions and 1/5.000 and 1/10.000 conjugate dilutions were tested. The horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG for ELISA and the alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG for immunoblot were used. We

followed the manufacturer's recommendations for the incubation parameters, substrate and the number of washes. 1/50 serum dilution and 1/10.000 conjugate dilution for ELISA and 1/100 serum dilution and 1/5.000 conjugate dilution for immunoblot were determined as optimal concentrations. By using the optimized ELISA, 26.2% (22/84) of rodents were found positive for hantavirus antibodies according to the determined cut-off value ($OD_{450/620}$: 0.325). By using immunoblot as a confirmatory test, 20 out of 22 ELISA positive samples could be studied because of the insufficient amount of sera and 17 of them was found positive in terms of DOBV antibodies. Of these rodents 11 were *Apodemus flavicollis*, three were *Apodemus agrarius*, two were *Microtus guentheri* and one was *Apodemus sylvaticus*. When the results of ELISA were compared to immunoblot results, the optimized ELISA's sensitivity and specificity were found as 100% and 95%, respectively. In this study, a method that can be used in the screening of rodent sera was constituted which uses commercial antigens that can be provided easily, gives fast and reliable results. Similar serological methods optimized for different types of rodents are of great importance for the realization of active follow-up and monitoring of the studies in the field.

Keywords: Hantavirus; rodent; serology; optimization.

GİRİŞ

Hantaviruslar *Bunyaviridae* ailesine ait altı büyük cinsten biri olup, tek iplikli, negatif yönelimli, segmentli RNA genomuna sahip, zarflı viruslardır. Küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere üç segmentten oluşan genomda, segmentler sırasıyla, viral nükleokapsid proteini, viral zarf glikoproteinleri ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlar. Bunlardan nükleokapsid proteini ve zarf glikoproteinleri, hantavirusların tanısı için geliştirilen çeşitli serolojik yöntemlerde antijen olarak kullanılmaktadır¹.

Hantaviruslar, asıl konakları kemiriciler ve böcekçiller olmasına rağmen, enfekte kemiricilerin salgılarındaki (salya, dışkı ve idrar) viral partiküllerin solunması ve nadiren enfekte kemiricilerle temas sonucu insanlara bulaşır². Herbir hantavirus tipi, o virusa özgül bir kemirici konak tarafından taşınmaktadır³. Hantaviruslar, kemiricilerde kronik asemptomatik enfeksiyonlara neden olmasına rağmen, insanlarda renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirus pulmoner sendrom (HPS) gibi yüksek mortaliteye sahip klinik tablolar oluşturmaktadır³. Hantavirus enfeksiyonlarında, hastalığın ayırt edici belirtilerinin olmaması ve şiddetinin etkene göre değişiklik göstermesi, tanıyı zorlaştırmaktadır. Virusa karşı etkili bir antiviral ajanın bulunmaması nedeniyle, enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır. Bu nedenle yaban hayatı ve sahadaki kemirici popülasyonlarında enfeksiyonun takip edilmesi, hantavirus prevalansının belirlenmesi ve olası salgın bölgelerinin öngörülebilmesi konusunda önemli veriler sunmaktadır.

Hantavirusların pek çok alt tipi bulunmakta ve bunlardan 22 tanesinin klinik bulgulara neden olabileceği bildirilmektedir³. Bu alt tiplerden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) viruslarının taşıyıcısı olarak bilinen *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* türlerinden kemiriciler, ülkemizde de yayılım göstermektedir⁴⁻⁸. Türkiye'de hantavirusların yaban hayatındaki kemiricilerdeki varlığı, ilk kez 2004 yılında yayınlanmış bir saha çalışmasında bildirilmiştir⁹. İnsanlardaki RSKA olguları ise ilk kez, 2009 yılında Zonguldak-Bartın bölgesinden rapor edilmiştir^{10,11}. 2009 yılından sonra farklı bölgelerde yapılan

saha çalışmalarında hem kemiricilerde hem de RSKA şüphesi olan olgularda hantavirus enfeksiyonları doğrulanmıştır¹²⁻¹⁶.

Eski Dünya hantaviruslarına karşı yaşamları boyunca antikor taşıyan kemiricilerin, serolojik olarak taranmasını ve sahada hızlı sonuç elde edilmesini sağlayacak ticari bir ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, insan serumlarının taranması için üretilmiş olan ticari enzim temelli immünolojik yöntem (enzyme immunoassay; ELISA) ve immünoblot antijenlerinin, kemirici örneklerinde tarama yapılabilmesi için uygun hale getirilmesi ve optimizasyonu amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (05.06.2009 ve 22.07.2011 tarih ve 41/2009 nolu karar) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Örnekler

Optimizasyon çalışmaları sırasında, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'ndan temin edilen, biri DOBV diğeri PUUV ile enfekte 2 kemiriciye (*Apodemus flavicollis* ve *Myodes glareolus* türlerinden) ve negatif oldukları bilinen 17 kemiriciye (*Microtus spp.*, *Apodemus mystacinus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerinden) ait serum örnekleri kullanıldı. Optimize edilen yöntemin test edilmesi için, Kırklareli bölgesinden "Sherman" tipi tuzak kapanlar ile yakalanan, *Apodemus flavicollis* (n= 49), *Apodemus sylvaticus* (n= 4), *Apodemus agrarius* (n= 16) ve *Microtus guentheri* (n= 15) türlerinden 84 adet kemiriciden alınan serum örnekleri kullanıldı. Kemiricilerin türleri, Krystufek ve Vohralik'in^{7,8} 2005 ve 2009 yıllarında bildirdiği tür anahtarına göre fenotipik özellikleri üzerinden tanımlandı.

ELISA Yönteminin Optimizasyonu

Hantavirusa karşı antikor varlığının belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı, Anti-Hantavirus Pool ELISA (Euroimmun, Almanya) kitleri kullanıldı. Prosedürün kemirici serumlarına göre optimize edilmesi için farklı serum ve konjugat dilüsyonları sınanırken, inkübasyon süresi, yıkama sayısı ve kullanılan konjugata uygun substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulandı.

Optimal serum konsantrasyonunun belirlenmesi için, THSK'dan temin edilen, pozitif ve negatif kontrol örnekleri 1/50, 1/100 ve 1/200 oranlarında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltilerek kullanıldı. Optimal konjugat konsantrasyonunun belirlenmesi için ise "horseshoe" peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı (Millipore, ABD) 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000 oranlarında PBS ile seyreltilerek kullanıldı.

Her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklendi ve her serum örneği için çift kuyucuk kullanıldı. Seyreltilmiş serum örneği eklenen plak, 37°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, tamamen boşaltıldı. Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000

oranlarında PBS ile seyreltilmiş HRP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından 100 µL eklendi ve 37°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra, yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar 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 substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklenerek, tepkime durduruldu ve 30 dakika içerisinde örneklerin optik dansiteleri (OD), mikroplak okuyucuda (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

ELISA yönteminde eşik değerinin belirlenmesi

ELISA yöntemi ile örneklerin taranması sırasında, THSK'dan temin edilen pozitif kontrol örnekleri kullanıldı. *Microtus spp.*, *Apodemus mystacinus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerinden 16 adet kemiriciye ait negatif kontrol örnekleri, optimize edilen ELISA yöntemi ile iki farklı günde tarandı. Optimize edilen yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü, örneklerin OD değerlerinin ortalamaları (\bar{x}) ve ortalamaların 3, 4, 5 ve 6 standart sapma (S) değerleri için hesaplandı. Eşik değeri, istatistiksel verilere dayanarak belirlendi.

İmmüno blot Yönteminin Optimizasyonu

Taranan örneklerin doğrulanması ve antikor varlığının hantavirusun hangi alt tipine karşı olduğunun belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş Euroline Anti-Hanta Profile 1 şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Prosedürün kemirici serumlarına göre optimize edilmesi için farklı serum ve konjugat dilüsyonları sınanırken, inkübasyon süresi, yıkama sayısı ve kullanılan konjugata uygun substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulandı.

Optimal serum konsantrasyonunun belirlenmesinde, 1/50 ve 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen negatif kontrol örnekleri, optimal konjugat dilüsyonlarının belirlenmesinde ise 1/5.000 ve 1/10.000 oranlarında 1x genel tampon ile seyreltilen alkalin fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı (Santa Cruz Biotechnology, ABD) kullanıldı.

İnkübasyon tepsisine yerleştirilen şeritler, 1.5 ml bloklama tamponu (Euroimmun, Almanya) içerisinde 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International, ABD) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sıvı aspire edildi ve şerit üzerine 1.5 ml 1/50 ve 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen negatif BALB/c kemiricilere ait serumlar eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında serum örnekleri aspire edildi ve üçer kez beşer dakika 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu içerisinde çalkalayıcıda inkübe edilerek, yıkandı. Yıkama sonrasında 1/5.000 ve 1/10.000 oranlarında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen AP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından 1.5 ml eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında konjugat aspire edildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında çalka-

layıcıda inkübe edildi. Substrat solüsyonu aspire edildikten sonra her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı ve kuruduktan sonra şerit üzerindeki bantların yoğunluğu değerlendirildi (Şekil 1A).

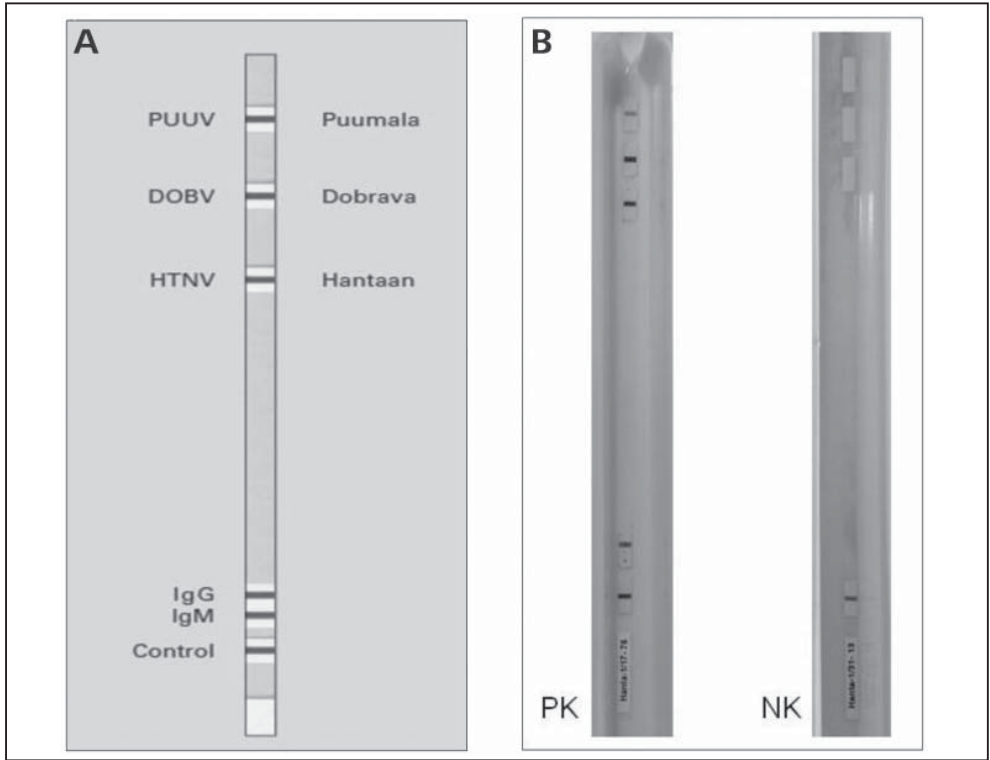
İstatistiksel Analiz

Optimize edilen ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü, kemirici serumlarının taranması sırasında belirlenen her bir standart sapma değeri için hesaplandı. Kırklareli bölgesinden toplanan kemiricilere ait veriler, SPSS 17.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve belirlenen eşik değerinin doğruluğu, "Receiver Operating Characteristic" (ROC) analizi ile sınıandı.

BULGULAR

ELISA Optimizasyonu

Pozitif ve negatif kontrol örneklerinin OD değerleri açısından birbirlerinden en belirgin şekilde ayrıldıkları dilüsyonlar olan 1/50 serum dilüsyonu ve 1/10.000 konjugat dilüsyonu, optimal değerler olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. (A) HTNV, DOBV ve PUUV'e karşı antikor varlığında immüno blot şeridinin temsili görünümü. (B) Pozitif (PK) ve negatif (NK) kontrol örneklerinin, optimal serum (1/100) ve konjugat (1/5.000) dilüsyonu ile inkübasyonu sonrası bant yoğunlukları.

Daha önce yapılan saha çalışmalarında yakalanan 16 negatif kemiriciye ait serum örneklerinin $\bar{x} + 6S$ 'ye denk gelen 0.325 OD değeri, eşik değer olarak kabul edilmiş ve bu değer altı negatif, üstü ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo I).

Kırklareli bölgesinden toplanan 84 kemiriciye ait serum örnekleri, optimize edilen yöntemle taranmış ve belirlenen eşik değerine göre bunların 22'sinde (%26.2) hantavirusa karşı antikor varlığı saptanmıştır. Bu kemiricilerden 14'ü *A. flavicollis*, 4'ü *A. agrarius*, 3'ü *M. guentheri* ve 1'i de *A. sylvaticus* türlerine aittir.

İmmüno blot Optimizasyonu

Antijen emdirilmiş şeritlerin üzerindeki bantların en yoğun olarak gözlemlendiği 1/100 serum dilüsyonu ve 1/5.000 konjugat dilüsyonu, optimal değerler olarak belirlenmiştir (Şekil 1B).

Optimize ELISA yöntemi ile pozitiflik saptanan Kırklareli bölgesi kemiricilerine ait serum örnekleri, optimize immüno blot yöntemi ile de doğrulanmıştır. Optimize ELISA yöntemi ile pozitiflik saptanan *A. flavicollis* türünden iki kemiriciye ait serum miktarı yetersiz olduğundan, immüno blot testi uygulanamamıştır. Dolayısıyla 20 örnek test edilmiş ve 17'sinde DOBV pozitifliği saptanmıştır. Bu kemiricilerden 11'i *A. flavicollis*, 3'ü *A. agrarius*, 2'si *M. guentheri* ve 1'i de *A. sylvaticus* türlerine aittir.

Tablo I. Ortalamaya eklenen her bir S için duyarlılık ve özgüllük değerleri				
$\bar{x} + 3S$ (OD 0.187)				
		İmmüno blot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %82
		+	-	
ELISA	+	17	12	
	-	0	53	
$\bar{x} + 4S$ (OD 0.233)				
		İmmüno blot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %91
		+	-	
ELISA	+	17	6	
	-	0	59	
$\bar{x} + 5S$ (OD 0.279)				
		İmmüno blot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %94
		+	-	
ELISA	+	17	4	
	-	0	61	
$\bar{x} + 6S$ (OD 0.325)				
		İmmüno blot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %95
		+	-	
ELISA	+	17	3	
	-	0	62	

İstatistiksel Değerlendirme

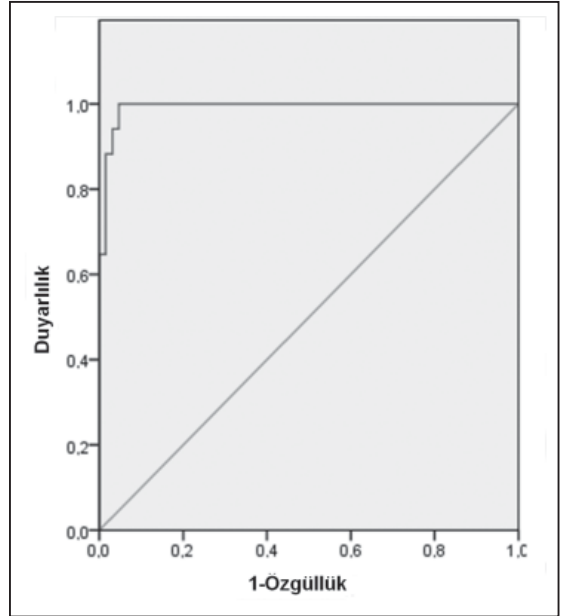
Optimize edilen ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü, kemirici serumlarının taranması sırasında belirlenen her bir standart sapma değeri için hesaplanmıştır (Tablo I).

ROC analizi ile duyarlılık ve özgüllüğün en yüksek olduğu eşik değeri, 0.326 olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Elde edilen bu değer, daha önce belirlenen eşik değeri ile uyumludur.

TARTIŞMA

Hantavirus enfeksiyonları çok büyük sıklıkla yaban hayatındaki enfekte kemiricilerin dışkı, idrar, salya gibi çıkartılarında bulunan virüslerin aerosoller aracılığı ile solunum yolundan alınması sonucu insanlara bulaşmaktadır¹⁷. Bu nedenle insanlardaki hantavirus enfeksiyonları, aynı bölgede bulunan kemirici popülasyonlarındaki hantavirus prevalansı ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla kemirici popülasyonlarının hantavirus enfeksiyonları açısından taranması, olası salgınların önceden öngörülebilmesi ya da var olan salgınların yaygınlığının tanımlanması için önemlidir. Her ne kadar kemiricilerde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile enfeksiyon tanısının konulabilmesi mümkünse de, her enfekte kemiricide PCR ile pozitif sonuç saptanamayabilmektedir¹⁸. Oysa seropozitifliğin saptanması, hantavirus ile enfekte olduğunda, kronik olarak virüsü taşıyan kemiricilerin yaygınlığının doğru bir şekilde belirlenebilmesi için kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile, hantavirus antikorları açısından kemiricilerin taranmasında kullanılabilecek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

İmmünofloresans testleri (IFA), hantavirus enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir¹⁹. Ancak IFA'nın üretimi sırasında kullanılan enfekte hücreler, hücre kültürü ortamında üretildiğinden ve bulaş riski yüksek olduğundan, biyogüvenlik düzeyi-3 laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle rekombinant DNA teknikleri ile üretilen hantavirus antijenlerinin kullanıldığı yöntemler tercih edilmektedir²⁰. İnsanda hantavirus antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanmasında kullanılan ticari ürünlerin varlığına rağmen, kemiriciler için kullanılabilecek optimize edilmiş ürünler kolay bulunmamaktadır. Nitekim, kemirici örneklerinin özellikle DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen RSKA



Şekil 2. Kırklareli bölgesinde yakalanan kemirici serumlarının OD değerlerine ait ROC eğrisi (eğrinin altında kalan alan 0.992).

etkeni hantaviruslar açısından taranması amacıyla üretilen herhangi bir ticari serolojik kit mevcut değildir. Ek olarak, ülkemizde de enfeksiyonlara neden olduğu bildirilen DOBV ve PUUV'nin aynı anda değerlendirilmesine yönelik bir optimizasyon çalışmasına da literatürde rastlanamamıştır.

Hantavirus tiplerinin antijenik olarak birbirlerinden farklı olması, aynı anda birden fazla hantavirus tipine karşı antikor varlığının araştırılmasını sağlayan yöntemlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu yöntemler, aynı anda çok sayıda kemirici örneğinin değerlendirilmesini ve hızlı sonuç elde edilmesini sağlamaktadır. Sanada ve arkadaşlarının²¹ yaptığı çalışmada, Amur (AMRV), Hokkaido (HOKV) ve Sin Nombre (SNV) hantavirus rekombinant nükleokapsid antijenleri kullanılarak optimize edilen ELISA yönteminin, sahadan yakalanan kemiricilerde ve bağışıklanmış laboratuvar hayvanlarında virusa karşı antikor varlığını saptayabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, kemiricilerde PUUV'e özgül IgG antikorlarını saptayabilen immünokromatografik bir yöntem geliştirilmiştir; ancak bu yöntem yalnızca *Arvicolinae* ailesinden olan kemirici türlerinde PUUV araştırılmasına yöneliktir^{22,23}. Yee ve arkadaşları²⁴ tarafından yapılan çalışmada ise, arazi çalışmaları sırasında minimum ekipman kullanılarak uygulanabilecek bir immüno blot yöntemi geliştirilmiştir²⁴. Yöntemin Western Blot ve ters transkripsiyon PCR sonuçları ile oldukça uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. İmmüno blot şeritleri, HPS etkenlerinden biri olarak bilinen SNV rekombinant nükleokapsid antijeni ile kaplı olduğundan, bu etkenin değerlendirilmesi için uygundur²⁴. Schountz ve arkadaşları²⁵ da, SNV'ye karşı antikor varlığını araştırmak üzere kullanılacak, arazi çalışmaları sırasında hızlı sonuç elde edilmesini sağlayan bir ELISA yöntemi oluşturmuşlardır. Yöntem, yaklaşık bir saatte sonuç vermesi ve tüm memeli türleri için kullanılabilir olması nedeniyle avantaj sağlamaktadır²⁵.

Optimize edilen ELISA ve immüno blot yöntemlerinin, Türkiye'de yapılan çalışmalarla da varlığı gösterilmiş olan DOBV ve PUUV'e özgül antikorların saptanmasında kullanılabilir olması, çalışmanın kısıtlılığıdır⁹⁻¹⁶. Bu nedenle, optimize edilen bu yöntemler, hantavirusların yalnızca bu tipleri için kullanılabilirler. Taşıyıcısı olan kemirici türünün Türkiye'de yayılım göstermesi sebebiyle, görülmesi beklenen hantavirus tiplerinden SAAV, genetik açıdan DOBV ile oldukça benzerdir^{26,27}. Ancak bu iki hantavirus tipi serolojik yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilemediğinden, bu çalışma sırasında optimize edilen ELISA ve immüno blot yöntemleri de yetersiz kalacaktır.

Çalışmamızda, optimize edilen ELISA yöntemi ile pozitif olarak saptandığı halde, optimize immüno blot yöntemi ile negatif olarak saptanan örnekler bulunmaktadır. Bunun nedeni; genetik açıdan birbirleriyle benzer olan ve aynı kemirici ailesi ile taşınan enfeksiyon etkenlerinin çapraz reaksiyona neden olabilmesi, ELISA ile immüno blot yöntemi arasındaki analitik duyarlılık farkı veya enfeksiyon etkeninin immüno blot şeritlerinde antijeni bulunan hantavirus tiplerinin farklı alt tiplerine özgül olması gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle yöntemin daha çok sayıda ve farklı türlerde kemiricilere ait serum örnekleri kullanılarak değerlendirilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Kırklareli bölgesinde yakalanan ve hantavirusa karşı antikor varlığı her iki yöntemle de test edilen 82 kemiriciden 17'sinde (%20.7) DOBV seropozitifliği saptanmıştır. Bu çalış-

ma ile Kırklareli bölgesindeki kemiricilerde ilk defa hantavirus seropozitifliği gösterilmiştir. Çalışmamızda optimize edilen yöntem, Eski Dünya hantaviruslarının kemiricilerde neden olduğu enfeksiyonları saptamayı hedef alan, hızlı sonuç verebilecek ve aynı anda çok sayıda örneğin çalışılmasına olanak sağlayabilecek bir testtir. Yöntem, kemiricilerde hantaviral enfeksiyonların varlığı açısından değerlendirme yapmayı sağlarken, serotiplendirme amacıyla kullanılmamaktadır. Bu çalışmada olduğu gibi, farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilecek serolojik yöntemler, özellikle alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi bakımından pratik öneme sahip olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mir MA. Hantaviruses. Clin Lab Med 2010; 30(1): 67-91.
2. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheeri A. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis 2003; 3(10): 653-61.
3. Klein SL, Calisher CH. Emergence and persistence of hantaviruses, pp: 217-52. In: Childs JE, Mackenzie JS, Richt J (eds), Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission. 2007, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
4. 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(2): 141-6.
5. Yigit N, Colak E, Sozen M, Karatas A. Türkiye'nin Kemiricileri, s: 1-111. Demirsoy A (ed), Rodents of Türkiye: Türkiye'nin Kemiricileri. 2006, Meteksan, Ankara.
6. Krystufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. Zool Middle East 2007; 42(1): 25-36.
7. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. 2005. Science and Research Centre of the Republic of Slovenia, Koper, Slovenia.
8. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. 2009. Science and Research Centre of the Republic of Slovenia, Koper, Slovenia.
9. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. J Wildl Dis 2006; 42(3): 672-6.
10. Ertek M, Buzgan T; Refik Saydam National Public Health Agency; Ministry of Health, Ankara, Turkey. An outbreak caused by hantavirus in the Black Sea region of Turkey, January-May 2009. Euro Surveill 2009; 14(20). pii: 19214.
11. Çelebi G, Pişkin N, Öktem MA, et al. Bir salgının anatomisi. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 25-29 Mart 2009, Antalya. Kongre Kitabı, s: 163, SS-11.
12. Kaya S, Çağlayık SY, Uyar Y, et al. Can hantavirus infections be predicted on admission to hospital? J Med Virol 2012; 84(11): 1790-6.
13. Sarıgüzel N, Hofmann J, Canpolat AT, et al. Dobrava hantavirus infection complicated by panhypopituitarism, Istanbul, Turkey, 2010. Emerg Infect Dis 2012; 18(7): 1180-3.
14. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, et al. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. Emerg Infect Dis 2011; 17(2): 303-4.
15. Gozalan A, Kalaycioglu H, Uyar Y, et al. Human puumala and dobrava hantavirus infections in the Black Sea region of Turkey: a cross-sectional study. Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13(2): 111-8.
16. Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, et al. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. Emerg Infect Dis 2014; 20(1): 121-5.
17. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheeri A. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis 2003; 3(10): 653-61.

18. Ryou J, Lee HI, Yoo YJ, et al. Prevalence of hantavirus infection in wild rodents from five provinces in Korea, 2007. *J Wildl Dis* 2011; 47(2): 427-32.
19. Vaehri A, Vapalahti O, Plyusnin A. How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. *Rev Med Virol* 2008; 18(4): 277-88.
20. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2): 412-41.
21. Sanada T, Kariwa H, Saasa N, et al. Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents. *J Vet Med Sci* 2012; 74(9): 1237-42.
22. Hujakka H, Koistinen V, Eerikainen P, et al. New immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2146-50.
23. Sirola H, Kallio ERK, Koistinen V, et al. Rapid field test for detection of hantavirus antibodies in rodents. *Epidemiol Infect* 2004; 132(3): 549-53.
24. Yee J, Wortman IA, Nofchissey RA, et al. Rapid and simple method for screening wild rodents for antibodies to Sin Nombre hantavirus. *J Wildl Dis* 2003; 39(2): 271-7.
25. Schountz T, Calisher CH, Richens TR, et al. Rapid field immunoassay for detecting antibody to Sin Nombre virus in deer mice. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(10): 1604-7.
26. Plyusnin A, Vaehri A, Lundkvist A. Genetic interaction between Dobrava and Saaremaa hantaviruses: now or millions of years ago? *J Virol* 2003; 77(12): 7157-8.
27. Sjölander KB, Golovljova I, Vasilenko V, et al. Serological divergence of Dobrava and Saaremaa hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiol Infect* 2002; 128(1): 99-103.