

BİR-ONSEKİZ YAŞ GRUBUNDA KABAKULAK VİRÜS SEROPOZİTİFLİĞİ

MUMPS VIRUS SEROPOSITIVITY IN SUBJECTS AGED 1-18 YEARS

Ahmet KALKAN¹
Mehmet ÖZDEN⁴

Yasemin BULUT²

Mehmet KILIÇ³

Erdal TAŞKIN³

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ

¹ İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

³ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

⁴ İmmünoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Kabakulak virüsü, seroprevalans, hemagglütinasyon inhibisyon testi

Keywords: Mumps virus, seroprevalence, hemagglutination inhibition test

Geliş: 21 Nisan 2004

Kabul: 16 Aralık 2004

ÖZET

Bu çalışmada, 1-18 yaş arasındaki bireylerde hemagglütinasyon inhibisyon (HAİ) yöntemi ile kabakulak virüs seropozitiflik oranının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma Temmuz 2003 tarihinde ve toplam 186 kişide gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan 186 kişinin 178'inde (%95.6) kabakulak virüsüne karşı HAİ antikorları pozitif bulundu. Kabakulak virüsüne karşı HAİ antikorları 1-3 yaş grubunda %93.6, 4-6 yaş grubunda %100, 7-9 yaş grubunda %96.8, 10-12 yaş grubunda %100, 13-15 yaş grubunda %92.3 ve 16-18 yaş grubunda %66.7 olarak saptandı. Dört-altı yaş grubunda saptanan titrelerin ortalaması diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). Sonuç olarak, Elazığ bölgesinde 1-18 yaş arasında kabakulak virüs seropozitifliği % 95.6 olarak saptandı. Sonuçlar, enfeksiyonun erken çocukluk döneminde kazanıldığını ve yaş ilerledikçe HAİ antikor titrelerinin azaldığını göstermektedir.

SUMMARY

The purpose of this study was to determine mumps virus seropositivity ratio using hemagglutination-inhibiting test in subjects aged between 1 and 18 years. The study was performed on 186 subjects in July 2003. There was seropositivity in Hemagglutination Inhibiting (HAİ) antibodies in 178 (95.6%) out of 186 subjects. Seropositivity was 93.6% in the 1-3 age group, 100% in the 4-6 age group, 96.8% in the 7-9 age group, 100% in the 10-12 age group, 92.3% in the 13-15 aged group, and 66.7% in the 16-18 age group. Mean titer level was significantly higher ($p<0.05$) in the 4-6 age group compared to other age groups. As a result, in the Elazığ region, mumps virus seropositivity was found as 95.6% in subjects aged 1-18 years. This result shows that mumps virus infections is acquired in early childhood and that with age HAİ antibodies decrease.

GİRİŞ

Kabakulak virüsü Paramyxoviridae ailesinde, Rubulavirus cinsinin bir üyesi olup protein ve lipid yapısında bir zarflı çevrili tek zincirli bir RNA virüsüdür (1). Bilinen tek kaynağı insandır. Kabakulak tüm dünyada endemik olup duyarlı topluluğun bulunduğu kuruluşlarda lokal epidemiler görülür (2). Özellikle çocukluk çağında görülür ve

bu yaş grubunda kendini sınırlarken, erişkinler çok organ tutulumuna daha eğilimlidir (3). Gelişmiş ülkelerdeki rutin aşılama kabakulağın etkilediği yaş grubunun ergenlik çağına kaydırmıştır. Kabakulak enfeksiyonu geçirenler yaşam boyu etkene karşı bağışık kalırlar (2). Rutin aşılanmanın yapılmadığı ülkelerde, özellikle toplu

kurumlarda yaşayanlarda duyarlı kişilerin belirlenerek aşılınması, enfeksiyona bağlı gelişebilecek komplikasyonların ve epidemilerin önlenmesi açısından önemlidir. Günümüzde bazı batı ülkelerinde alınan ciddi önlemlerle hastalığın eliminasyonu sağlanmış ve bir çok ülkede de eliminasyon aşamasına gelinmiştir. Türkiye'de kabakulak aşısı rutin aşılama programı içinde yer almaktadır.

Bu çalışmada, 1-18 yaş arasındaki çocuklarda hemagglütinasyon inhibisyon (HAİ) yöntemi ile kabakulak virüs seropozitiflik oranının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniklerine başvuran toplam 186 kişi çalışmaya alındı. Çalışma için serum örnekleri Temmuz 2003 tarihinde toplandı. Çalışmaya alınan çocuklara ve/veya ailelerine çalışmanın kapsamı ile ilgili bilgi verildi, tanımlayıcı bilgilerin sorulduğu bir bilgi formu dolduruldu. Beşer ml venöz kan alındı ve serumları ayrılarak çalışılınca kadar -80° C'de saklandı.

Test serumları, HAİ'de kullanılmadan önce spesifik olmayan inhibitörlerin yıkımı için bir dizi işleme alındı. Bu amaçla, 100 µl serum örneği alınıp üzerine 50 µl tripsin [0.01 M fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su, pH 7.2 (PBS) içinde hazırlanan % 0.8 (w/v) tripsin (Difco Laboratories, Detroit, MI)] eriyiği eklenmiş ve 56°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışımlara, 300 µl 0.01 M potasyum periyodat eklenmiş ve oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, örnekler 300 µl %1 gliserol ilave edilmiş ve inkübasyon tekrarlanmıştır. Son olarak, 250 µl PBS (pH 7.2) eklenerek 1/10' luk serum dilasyonları elde edilmiştir.

Hücre ve Virüs: Çalışmada virüsün üretimi için Vero hücreleri kullanılmıştır (Şekil 1-üst). Hücreler, % 5 CO₂ içeren ortamda üretilmiştir. Hücreler, % 10 oranında fetal siğir serumuna (FBS; SIGMA, St Louis, MO, ABD) sahip Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DME/F-12; SIGMA) ortamında üretilmiştir. Ortamlara ayrıca, penisillin (100 ünite/ml), streptomisin (0.01 mg/ml) ve tripsin (0.5 mg/ml) eklenmiştir. Kabakulak virüsü, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. Vero hücreleri kabakulak virüsü ile infekte edilmiş ve hücrelerde sitopatik etkilerin belirgin olmasına kadar 37° C'de inkübe edilmiştir (Şekil 1-alt). Daha sonra üst sıvı toplanmış ve 4° C'de 10 dakika 500 g santrifüjle hücre artıklarından ayrılmış ve testlerde kullanılmıştır.

Hemagglütinasyon (HA) ve Hemagglütinasyon İnhibisyon (HAİ) Testi: Bu testler Burleson ve ark. (4) tarafından daha önce belirtildiği şekilde uygulanmış, ancak bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Hemagglütinasyon titresini belirlemek için, virüs U tabanlı mikrotitrasyon tablalarında PBS (pH 7.2) içinde 1:2'den başlayarak ve iki kat azalan bir düzende sulandırılmıştır. Sulandırma sonucunda kuyucukta bulunan 50 µl virüs süspansiyonu üstüne eşit miktarda PBS ilave edilmiştir. Daha sonra, 100 µl % 0.5'lik O grubu insan eritrositleri eklenip, mikrotitrasyon tablaları 10 dakika 37° C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, tablalar hemagglütinasyonun gerçekleşmesi için 4° C'de iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu deney sonucunda, eldeki kabakulak virüsü hemagglütinasyon titreleri belirlenmiş ve bu titreler HAİ testi için temel olarak alınmıştır. Hemagglütinasyon inhibisyon testi için, U tabanlı mikrotitrasyon tablalarında her serum örneği, PBS içinde 1/10'dan başlayarak 1/1280'e kadar sulandırılmıştır.

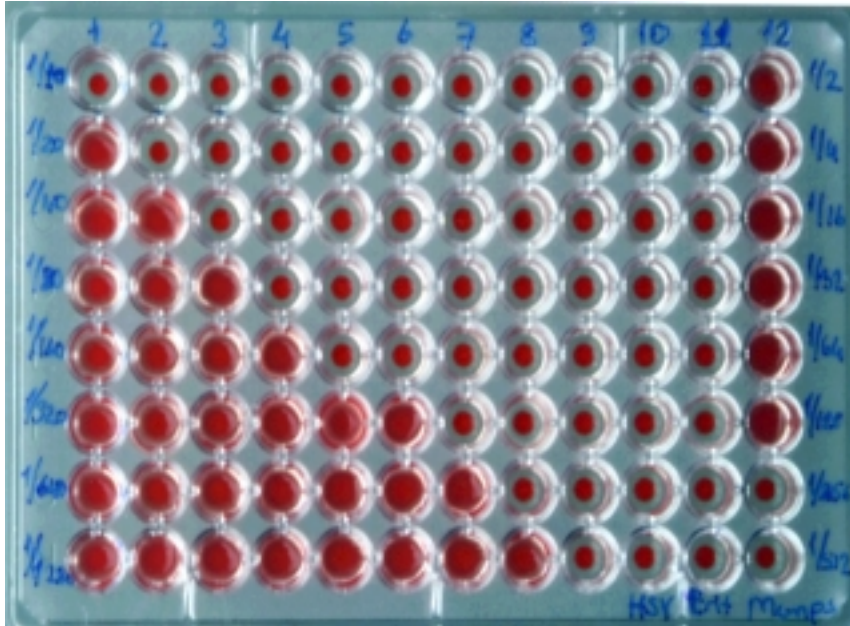
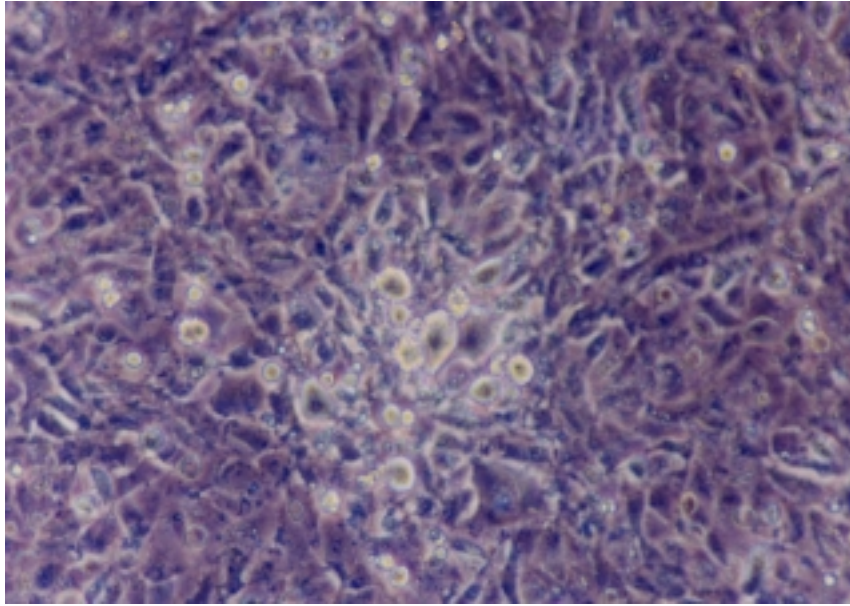
Bu işlemten sonra her kuyucuktaki 50'şer µl'lik serum sulandırmalarının üzerine 50 µl 4HA ünitesi sulandırılmış virüs ilave edilip, virüs-serum karışımları oda ısısında 60 dakika bekletilmiştir. Inkübasyondan sonra, kuyucuklara 100 µl %0.5 konsantrasyonunda O grubu eritrosit süspansiyonu bırakılmış ve tablalar HA testinde olduğu gibi inkübe edilmiştir. Sonuçlar, bu sürenin sonunda saptanan hemagglütinasyonun inhibisyonuna göre belirlenmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde; Statistical Package for Social Sciences version 10.01 (SPSS) bilgisayar programı kullanıldı. Hemagglütinasyon inhibisyon antikorları pozitif saptananlarda yaş gruplarına göre ortalama titrelerin karşılaştırılmasında Oneway ANOVA, Post Hoc test olarak da Tukey B testi; yaş gruplarına göre seropozitifliğin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. p< 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

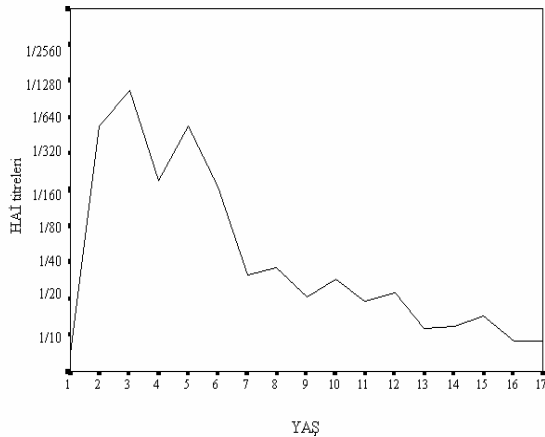
Çalışma grubunu oluşturan toplam 186 kişinin 77'si (%41.4) kız, 109'u (%58.6) erkek, yaş aralığı 1-18 ve yaş ortalaması 7.17±4.76 idi. Çalışmaya alınan 186 kişinin 178'inde (% 95.6) kabakulak virüsüne karşı HAİ antikorları pozitif bulundu. Pozitif bulunan HAİ titrelerinin dağılımı Tablo 1'de sunulmuştur.

Kabakulak virüsüne karşı HAİ antikorları pozitif ve negatif saptanan kişilerin yaşlara göre dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur. Onaltı-onsekiz yaş grubunda HAİ antikor pozitifliği diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.05). Hemagglütinasyon inhibisyon antikorları pozitif saptananlarda



Şekil 1. Üst: Vero hücreleri kabakulak virüsü ile infekte edilmiş ve sitopatik etkinin belirgin olmasından sonra üst sıvı toplanıp testlerde kullanılmıştır (x 200). Alt: Hemaglutinasyon inhibisyon testi 96 kuyulu mikrotitrasyon gerçekleştirilmiş ve hemaglutinasyonun tablalarında en-gellendiği serum dilusyonu saptanmıştır.

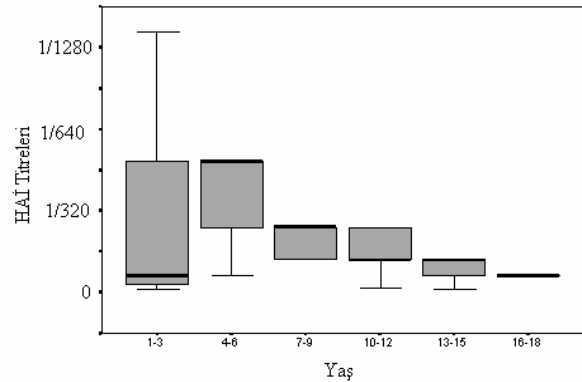
ortalama antikor titrelerinin yaş arttıkça azaldığı gözlenmiştir (Şekil 2). Yaş gruplarına göre incelendiğinde, 4-6 yaş grubunda saptanan titrelerin ortalaması diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 3). Hemaglutinasyon inhibisyon antikorları pozitif saptanan 178 kişinin 19'unda (%10.6) kan transfüzyonu, dördünde (% 2.2) ise kan ürünü alma öyküsü vardı.



Şekil 2. Hemaglutinasyon inhibisyon (HAİ) titrelerinin yaşlara göre dağılımı

TARTIŞMA

Klinik veya subklinik kabakulak infeksiyonundan sonra hayat boyu devam eden bağışıklık gelişir. Bağışıklığın belirlenmesinde nötralizasyon testi, HAİ, plak redüksiyon, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),



Şekil 3. Ortalama hemaglutinasyon inhibisyon (HAİ) titrelerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

kompleman birleşmesi ve hücrel immün cevabın ölçülmesi gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır (5-7). Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili farklılıklar olabilmektedir (5). Nötralizan antikorlar konvelesan dönemde ortaya çıkar ve saptanabilir titrelerde yıllarca devam eder. Kabakulağa karşı bağışıklığı belirlemede nötralizasyon testi güvenilir test olmakla birlikte uygulamadaki zorluklar nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır. Kabakulak geçirenlerde gelişen HAİ antikorlarının ölçümü kolay olup yıllardan beri uygulanmaktadır. Ancak HAİ testinde diğer paramiksovirusler ile çapraz reaksiyonlar olabilmektedir (2, 8). Bununla birlikte, kabakulak virüsüne karşı antikorların saptanmasında HAİ testi, RAİ ve nötralizasyon testi ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda bu testlerle iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (9, 10). Kabakulak seropozitifliğinin araştırıldığı bu çalışmada, kolay uygulanabil-

Tablo1. Kabakulak prevalans araştırmasında pozitif hemaglutinasyon inhibisyon (HAİ) testi titrelerinin dağılımı

Pozitif titre sayısı	Titreler							
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
178	3	8	10	24	50	43	24	16

Tablo 2. Çalışma grubunun cinsiyet, hemaglutinasyon inhibisyon (HAİ) testi titresi, kan transfüzyonu ve kan ürünü alımı yönünden yaş gruplarına göre dağılımı

Özellikler	Yaş grupları						Toplam
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	
Cinsiyet							
Erkek	30 (63.8)	24 (55.8)	19 (61.3)	18 (54.5)	16 (61.5)	2 (33.3)	109 (58.6)
Kız	17 (36.2)	19 (44.2)	12 (38.7)	15 (45.5)	10 (38.5)	4 (66.7)	77 (41.4)
HAİ titresi							
Pozitif	44 (93.6)	43 (100)	30 (96.8)	33 (100)	24 (92.3)	4 (66.7)*	178 (95.7)
Negatif	3 (6.4)	-	1 (3.2)	-	2 (7.7)	2 (33.3)	8 (4.3)
Kan transfüzyonu	3	4	5	5	2	-	19
Kan ürünü	3	1	-	-	-	-	4

* $p<0.05$

mesi ve diğer diğer serolojik testlerle iyi korelasyon göstermesi nedeniyle serum örneklerinde HAİ testi uygulanmıştır.

Kabakulak seroepidemiolojisi ile ilgili çalışmalarda değişik ülkeler ve farklı populasyonların araştırıldığı çalışmalardan %84-91.3 arasında değişen seropozitiflik oranları bildirilmiştir (11-13). Türkiye'de İstanbul'da değişik yaş gruplarından oluşan popülasyonda % 85.7 (14); Sivas'ta yetişkin nüfusta % 86.8 (15); Ankara'da iki yaş grubunda %22.6, 12-15 yaş grubunda ise %95.6 (16); yine Ankara'da 12-23 aylık çocuklarda % 15.1, 48-59 aylık çocuklarda % 45.2 oranında kabakulak seroprevalansı (17) bildirilmiştir. Özsan ve ark. (18) Ankara'da 0-5 yaş grubunda kabakulak virüsüne karşı %47.5 oranında HAİ antikor pozitifliği saptadıklarını, seropozitifliğin yaşlara göre 0-6 ay arasında %42.8, 7-12 ay arasında %16.6, 1-2 yaş arasında %44.1, 2-3 yaş arasında %58.8 ve 3-5 yaş arasında %57.7 olduğunu bildirmişlerdir. Akın ve ark. (14) Ankara'da değişik yaş gruplarında HAİ testi ile serum örneklerinde %85.7 oranında 1/10 ile 1/5120 arasında değişen titrelerde seropozitiflik saptamışlardır. Seropozitifliğin yaş gruplarına göre; 0-15 yaş grubunda % 85, 16-30 yaş grubunda % 86.4, 31-45 yaş grubunda % 87.5 ve 46-60 yaş grubunda % 83.9, 60 yaşın üzerinde % 70.6 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalar değerlendirildiğinde, Türkiye'den bildirilen oranların ülke dışından bildirilen oranlara yakın olduğu görülmektedir. Aynı şekilde Türkiye'nin değişik bölgelerinden bildirilen oranların da biri birine yakın olduğu ve infeksiyonun Türkiye'nin tüm bölgelerde erken çocukluk döneminde kazanıldığı anlaşılmaktadır.

Çalışmada HAİ yöntemi ile 1-18 yaş arasındaki 186 çocuğun 178'inde (% 95.6) kabakulak virüsüne karşı 1/10 ile 1/1280 arasında değişen titrelerde seropozitiflik saptanmıştır. Yazarların daha önce askerlerde yaptıkları çalışmada (19), askerlerde kabakulak virüsüne karşı HAİ antikorları pozitifliğini %93.4 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada (19), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaşayanların %100'ünde seropozitiflik bulunurken, Ege Bölgesi'nde yaşayanlarda pozitiflik oranı %87 olarak saptanmıştır. Her iki çalışmadan da elde edilen sonuçlara göre, Elazığ bölgesindeki seroprevalansın Türkiye'nin diğer bölgelerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmada, yaş gruplarına göre saptanan HAİ antikor pozitifliği oranlarının biri birine yakın oldukları, 16-18 yaş grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca, 4-6 yaş grubunda saptanan titrelerin ortalamasının diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması ve antikor titrelerinin yaş ilerledikçe azalması dikkate alındığında bölgede infeksiyonun çok küçük yaşlarda kazanıldığını düşündürmektedir. Her yaş grubunda kan transfüzyonu yapılanların oranının benzer olması, çalışmaya alınanların hiçbirinde aşı öyküsünün olmaması saptanan pozitiflik oranlarının doğal yollardan kazanılan infeksiyona bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, Elazığ bölgesinde 1-18 yaş arasında kabakulak virüs seropozitifliği %95.6 olarak saptanmıştır. Sonuçlar, infeksiyonun erken çocukluk döneminde kazanıldığını ve yaş ilerledikçe HAİ antikor titrelerinin azaldığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. White DO, Fenner F. *Medical Virology*. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1994: 456-74.
2. Baum SG, Litman N. Mumps virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 1496-501.
3. <http://www.who.int/vaccines/en/mumps.shtml>
4. Burleson GF, Chambers TM, Wiedbrauk DL. <http://www.who.int/vaccines/en/mumps.shtml>. *Virology: A Laboratory Manual*. San Diego: Academic Press, 1992: 130-7.
5. Linde GA, Granstrom M, Orvell C. Immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass enzyme-linked immunosorbent assays compared with microneutralization assay for serodiagnosis of mumps infection and determination of immunity. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1653-8.
6. Popow-Kraupp T. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mumps virus antibodies. *J Med Virol* 1981; 8: 79-88.
7. Chiba Y, Dzierba JL, Morag A, Ogra PL. Cell-mediated immune response to mumps virus infection in man. *J Immunol* 1976; 116: 12-5.
8. Julkunen I. Serological diagnosis of parainfluenza virus infections by enzyme immunoassay with special emphasis on purity of viral antigens. *J Med Virol* 1984; 14: 177-87.
9. Daugharty H, Warfield DT, Nemingway ND, Casey HL. Mumps class-specific immunoglobulins in radioimmunoassay and conventional serology. *Infect Immun* 1973; 7: 398-402.
10. Denoyel GA, Gaspar A, Peyramond D. A solid-phase reverse immunosorbent test (SPRIST) for the demonstration of specific-mumps virus IgM-class antibody. *Arch Virol* 1982; 71: 349-52.

11. **Nassar NT, Habbal A.** Seroimmunity to measles and mumps among medical students and nurses in a teaching hospital in Lebanon. *J Am Coll Health* **1993**; 42: 41-2.
12. **Doern GV, Robbie L, St Amand R.** Comparison of the Vidas and Bio-Whittaker enzyme immunoassays for detecting IgG reactive with varicella-zoster virus and mumps virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1997**; 28: 31-4.
13. **Struwing JP, Hyams KC, Tueller JE, Gray GC.** The risk of measles, mumps, and varicella among young adults: a serosurvey of US Navy and Marine Corps recruits. *Am J Public Health* **1993**; 83: 1717-20.
14. **Akın A, Altanlar N, Kocabeyoğlu Ö.** Vero hücre kültürlerinden hazırlanan kabakulak virus antijenlerinin kullanıldığı hemaglutinasyon önlenim testiyle değişik yaş gruplarında seropozitifliğin araştırılması. *Mikrobiyol Bült* **1996**; 30: 399-404.
15. **Sümer H, Sümer Z, Poyraz Ö.** Eğerci Belediyesi yetişkin nüfusunda kabakulak seropozitifliği. *İnfek Derg* **1997**; 3: 287-291
16. **Şıklar Z, Tıraş Ü, Özışık AD ve ark.** Türkiye'nin başkentinde bir araştırma hastanesine başvuran 1-15 yaş grubu çocuklarda kabakulak seroprevalansı. *Gülhane Tıp Dergisi* **2002**; 44: 134-6.
17. **Yıldırım RC, Yılmaz N, Artuk Ç, Çankaya R.** Ankara Batıkent 1 Nolu Sağlık Ocağı Bölgesi'nde 12-59 aylık çocuklarda kabakulak seroprevalansı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1998**; 28: 111-6.
18. **Özsan M, Aykut E, Cengiz AT, Özkul A, Karaarslan A.** 0-5 yaş arasındaki çocuklarda kabakulak virus antikor pozitifliğinin araştırılması. *Mikrobiyol Bült* **1998**; 32: 137-42.
19. **Kalkan A, Bulut Y, Gödekmerdan A, Kazaz S, Doymaz MZ.** Askerlerde kabakulak virüs antikorlarının hemaglutinasyon inhibisyon yöntemi ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1999**; 29: 199-202.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Ahmet KALKAN
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
23119 ELAZIĞ
e-posta: akalkan61@hotmail.com