



**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KAN MERKEZİNE BAŞVURAN DONÖRLERDE  
BATI NİL VİRÜSÜ SEROPREVALANSININ  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ayla ERSOY KILINÇ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN**

**HATAY-2013**

**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KAN MERKEZİNE BAŞVURAN DONÖRLERDE  
BATI NİL VİRÜSÜ SEROPREVALANSININ  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ayla ERSOY KILINÇ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN**

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Uzmanlık Grubu tarafından 1206M0125/2012  
proje numarası ile desteklenmiştir.**

# TEZ ONAY SAYFASI

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Adı: MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KAN MERKEZİNE BAŞVURAN DONÖRLERDE  
BATI NİL VİRÜSÜ SEROPREVALANSININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. Ayla ERSOY KILINÇ**

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....

.....

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....

Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN  
Tez Danışmanı

## TEZ JÜRİSİ

1. Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN.....

2. Doç. Dr. Sabahattin OCAK.....

3. Doç. Dr. Ömer EVİRGEN .....

4. Yrd. Doç. Dr. Vicdan KÖKSALDI MOTOR .....

5. Doç. Dr. Nizami Duran .....

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>II. TABLO LİSTESİ</b> .....	v
<b>III. ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	vi
<b>IV. KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ</b> .....	vii
<b>V. TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>VI. ÖZET</b> .....	ix
<b>VII. ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Tarihçe .....	3
2.2. Batı Nil Virüsünün Yapısı, Genomu, Sınıflaması.....	4
2.3. Virüsün Vektör ve Rezervuarları.....	7
2.4. Türkiye’de BNV Epidemiyolojisi.....	11
2.5. Bulaşma Yolları.....	15
2.5.1. Kan Transfüzyonu.....	15
2.5.2. Organ Nakli.....	16
2.5.3. Emzirme.....	16
2.5.4. Transplental Geçiş.....	16
2.5.5. Laboratuvar dan Bulaş.....	17
2.6. Patogenez ve Patoloji.....	17
2.7. Klinik.....	19
2.8. Batı Nil Ateşi Vaka Tanımı.....	21
2.8.1. ICD 10 Tanı Kodu.....	21
2.8.2. Klinik kriterler.....	21
2.8.3. Laboratuvar kriterleri.....	21
2.8.4. Epidemiyolojik kriterler.....	22

2.8.5. Vaka sınıflaması.....	22
2.8.6. Bildirim şekli.....	22
2.9. Tanı.....	24
2.9.1. Serolojik testler.....	25
2.9.2. Moleküler testler.....	27
2.9.3. Virüs izolasyonu.....	28
2.9.4. Antijen testleri.....	28
2.10. Tedavi.....	28
2.11. Korunma ve Kontrol.....	30
2.11.1. Aşı.....	33
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>34</b>
3.1. ELISA Testi ile IgG ve IgM tipi antikorların tespiti.....	34
3.1.1. Serum örneklerinin çözülmesi.....	34
3.1.2. ELISA Yöntemi.....	35
3.1.3. IgG için Cut-off hesaplanması.....	36
3.1.4. IgM için Cut-off hesaplanması.....	36
3.2. Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	37
3.3. Real Time PCR Yöntemi ile Batı Nil Virüsü Tespiti.....	37
3.3.1. Test Prosedürü.....	38
3.3.2. Parametre-Spesifik Ajanların ve IPC'nin Hazırlanması.....	38
3.3.3. Pozitif Kontrollerin (Standartların) Hazırlanması.....	38
3.3.4. Reaksiyon karışımının hazırlanması.....	38
3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>53</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>54</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>63</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo no</b>		<b>Sayfa no</b>
<b>Tablo 1</b>	Reaksiyon karışımının bileşenleri ve hacimleri	39
<b>Tablo 2</b>	Isı protokolü	39
<b>Tablo 3</b>	Donörlerin yaş aralığına göre dağılımı	42
<b>Tablo 4</b>	Donörlerin yerleşim yerlerine göre dağılımı	43

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil no		Sayfa no
Şekil 1	Batı Nil Virüsünün Genomik Yapısı ve Proteinleri	5
Şekil 2	Batı Nil Virüsünün bulaşma döngüsü	10
Şekil 3	Yeni BNV sirkülasyonu olan ülkeler ve komşulukları (Rusya ve Macaristan)	13
Şekil 4	BNV salgınları ve Ana Göç Yolları	14
Şekil 5	Batı Nil Virüsü yayılması ve bağışıklık sistemi kontrolü	19
Şekil 6	Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı BNV enfeksiyonları vaka yönetim algoritması ve örnek gönderme kriterleri.	23
Şekil 7	BNV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında seroloji	27
Şekil 8	Batı Nil Virüs IgG ELISA Testinde Kullanılan Kalibrasyon Grafiği	36
Şekil 9	PCR ürünü kanal 640'da Melting Curve modunda tanımlanması.	40
Şekil 10	IPC ürünü Kanal 705'te Melting Curve modunda tanımlanması.	40
Şekil 11	IgG pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı	43
Şekil 12	IgG pozitifliğinin yerleşim yerlerine göre dağılımı	44

## KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>BNV(WNV)</b>	: Batı Nil virüsü
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>C</b>	: Kapsid (Capsid)
<b>CCL5</b>	: Kemokin (C-C motifi) ligandı 5
<b>CCR5</b>	: Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5
<b>CD4</b>	: Cluster of Differentiation 4
<b>CD8</b>	: Cluster of Differentiation 8
<b>CXCL10</b>	: C-X-C motifi kemokin 10
<b>CXCR3</b>	: C-X-C kemokin motifi reseptörü 3
<b>DEET</b>	: N,N-dietil-m-toluamid
<b>E</b>	: Zarf (Envelope)
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	: İnterferon-alfa
<b>IPC</b>	: Internal positive control
<b>JEV</b>	: Japon ensefaliti virüsü
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>NTPaz</b>	: RNA trifosfataz
<b>PZR (PCR)</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>prM/M</b>	: Membran öncülü/Membran
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RU/ml</b>	: Relatif ünite/mililitre
<b>SLE</b>	: St.Louis ensefaliti
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör-alfa



## TEŞEKKÜR

Asistanlığım döneminde çalışma azmi ve hastalarına gösterdiği değerle her zaman örnek aldığım bu tezin hazırlanmasında değerli zamanını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Bölüm Başkanı Doç. Dr. Yusuf Önlen'e sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca hoşgörü ortamı içerisinde bizleri eğitime gayreti içerisinde değerli bilgilerinden ve engin tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Sabahattin Ocağ ve Doç. Dr. Ömer Evirgen'e, Yrd. Doç. Dr. Vicdan Köksaldı Motor'a, birlikte çalıştığım sevgili asistan arkadaşlarıma, klinikte her zaman yardımcı, güler yüzlü hemşire ve personelimize teşekkürlerimi sunarım.

Bizleri kendi asistanlarından ayırmadan her zaman varlıkları ile bizlere destek olan tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve teknisyenlerine, tez çalışmam sırasında değerli vaktini çokça aldığım, sabrını ve engin bilgilerini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Nizami Duran'a tüm yardımları için çok teşekkür ederim.

Daima yardıma hazır arkadaşım Ela'ya desteği ve pozitif düşüncesiyle yanımda olduğu için, Özgür'e tüm emekleri için ve dostlarıma manevi destekleri için teşekkür ederim.

Dualarıyla, sevgisiyle, koşulsuz desteğiyle her an yanımda olan canım annem Ayşe Ersoy'a, rahmetle andığım aslında her zaman yanımda hissettiğim canım babam Duran Ersoy'a, kardeşlerime, eşime ve yaşama sevincim canım kızım Deren'ime, varlıklarından dolayı onur duyduğum tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ayla ERSOY KILINÇ

HATAY-2013

## ÖZET

### Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezine Başvuran Donörlerde Batı Nil Virüsü Seroprevalansının Araştırılması

**Giriş ve Amaç:** İlk kez 1937'de ateşli bir hastadan izole edilen Batı Nil virüsü (BNV), Flaviviridae familyasının Flavivirus cinsinde yer alan, yaklaşık 50 nm çapında, zarflı, tek zincirli pozitif polariteli RNA genomu içeren bir arbovirüstür. 1999 yılına kadar coğrafi dağılımı Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan, batı ve orta Avrupa ile sınırlı iken virüs bu yılda, ABD'de ilk kez saptanmış ve geçen zaman içinde tüm kıtaya hızla yayılarak önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. BNV'nun yaşam döngüsü başlıca kuşlar ve sivrisinekler arasında gerçekleşmekte olup insan, at gibi omurgalılar bu döngüde rastlantısal konaktır. İnsana başlıca *Culex* cinsi sivrisineklerin ısırmasıyla bulaşan BNV enfeksiyonlarının önemli bir kısmı asemptomatik serokonversiyonla sonuçlanmaktadır. Olguların %1'den az kısmında MSS bulguları ve nöroinvazif hastalık gelişmektedir. Yeni alanlarda BNV salgınlığının artışı, hastalığın seyrinde menenjit/ensefalit gibi ciddi vakaların öne çıkmasıyla virüs yeniden önem kazanmış ve virülansı artmıştır. 1964 yılından, bu yana çeşitli araştırmalarla ülkemizde BNV enfeksiyonu varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, sağlıklı bir popülasyonda BNV seroprevalansının saptanması ve kan donörlerinde virüs aktivitesini tespit ederek ulusal verilere katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Ocak-Nisan 2013 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran 200 kan donörüne ait serum örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Serum örneklerinde BNV IgG ve BNV IgM antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmış ve pozitif bulunan örnekler PCR yöntemi uygulanmıştır.

**Bulgular:** Çalışmada; 19 (%9.5) donöre ait serum örneğinde BNV IgG, 1 (%0.5) donöre ait serum örneğinde BNV IgM antikor pozitifliği ELISA yöntemiyle saptanmıştır. Pozitif 20 örneğe karşılaştırma amacıyla real-time PCR testi uygulanmış, örneklerin hepsinde PCR negatif saptanmıştır.

**Sonuç:** Her ne kadar çalışmamızda donörlerde BNV RNA varlığı saptanmamış olsa da seropozitifliğinin saptanmış olması, ülkemizde doğrulanmış BNV enfeksiyonlarının bildirilmesi gibi nedenlerle kan/kan ürünleriyle BNV bulaş riski olabileceği göz ardı edilmemelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Batı Nil Virüsü, kan donörü, seroprevalans, ELISA, PZR.

## ABSTRACT

### **Investigation of West Nile virus Seroprevalence in Blood Donors Who were admitted to Mustafa Kemal University Medical Faculty Blood Center**

**Background and Aim:** West Nile virus (WNV) is which first isolated from a patient with high fever in 1937, a member of Flaviviridae family, in Flavivirus genus, about 50 nm diameter, enveloped, single positive polarized RNA genom an Arbovirus. Presence of the virus was limited within African countries, Middle-East, West and Central Europa untill 1999. In 1999, the virus has been detected in USA and, by the time, it has spreaded all around continent and became a serious health problem. Life cycle of WNV primary runs between birds and mosquitos but, in vertebrates and horse like humans, are accidental hosts. WNV infections are which spread by Culex species mosquitos bites and are usually ends by asymptomatic seroconversions. Central Nervous System symptoms and neuroinvasive affections appear less than 1% of the cases. Importance of virus and virulence of the agent increased by more WNV outbreaks in new regions and serious meningitis / encephalitis clinical cases. From 1964 till nowadays WNV's presence has been shown in our country by various studies. In our study, we aimed to detect the seroprevalence of WNV in a healthy population and contribute to international scientific database by detecting virus activity in our region.

**Material and Method:** 200 blood serum samples which were obtained from blood donors that admitted to the Mustafa Kemal University Hospital's Blood Center between January 2013 to April 2013. Presence of WNV IgG and WNV IgM antibodies has been investigated by ELISA and later the positive samples has been studied by PCR method.

**Results:** In this study; 19 (9.5%) WNV IgG serum samples and 1 (0.5%) WNV IgM serum sample has been determined positive by ELISA. All 20 positive samples were investigated by PCR method for crosscheck and all samples were determined negative.

**Conclusion:** Eventhough we couldn't detect WNV RNA presence, because of detected seropositive results and declarations of confirmed WNV infections in our country, risk of WNV transmission shouldn't be ignored.

**Key words:** West Nile virus, blood donor, seroprevalence, ELISA, PCR.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

1937’de ilk kez izole edilen Batı Nil virüsü (BNV), *Flaviviridae* familyasının *Flavivirus* cinsinde yer alan yaklaşık olarak 50 nm çapında, zarflı, ikozahedral nükleokapsidli, tek zincirli pozitif polariteli RNA genomu içeren bir arbovirüstür. Serolojik olarak Japon ensefaliti virüsü (JEV) antijenik kompleksi içerisinde sınıflanır. RNA genomu 3 adet yapısal; kapsid (C), membran (prM/M), zarf (E) proteini ve 7 adet de yapısal olmayan (Non-structural) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 proteini kodlar (1).

Yapısal proteinler, genel olarak viral partikül oluşumunda yer alırken, yapısal olmayan proteinler viral replikasyonu, virion yapılanmasını ve konağın doğal immün yanıtından kaçışını sağlamaktadır (2).

BNV’nin doğadaki sivrisinek-kuş-sivrisinek döngüsünde, asıl olarak *Culex* cinsi sivrisinek türleri rol almaktadır (1, 3). BNV’nin temel bulaşı özellikle sivrisinek ısırığı ile olur; ancak enfeksiyonun insanlara kan/kan ürünlerinin transfüzyonu, organ nakli, diyaliz, intrauterin veya anne sütü, perkütan ve aerosol yol, virüse mesleki maruziyet ile de bulaşabildiği gösterilmiştir (3-5).

İnsanlarda BNV enfeksiyonlarının inkübasyon periyodu 2-15 gün arasında değişmektedir (genel periyod 2-6 gündür). BNV enfeksiyonlarının önemli bir kısmı asemptomatik serokonversiyonla sonuçlanmaktadır. Etkilenen olguların yaklaşık %20’sinde "Batı Nil ateşi" adı verilen ateşli hastalık tablosu gelişirken, %1’den az hastada merkezi sinir sistemi bulguları ve nöroinvazif hastalık gelişir. Ciddi nonnörolojik komplikasyonlar insanlarda seyrek ve myokardit, pankreatit ve fulminan hepatiti içerir (6, 7).

Genel olarak Afrika, Orta Doğu, Asya, Avustralya ve Güney Avrupa'da yaygın iken son zamanlarda Amerika dahil pek çok ülkede yayılmıştır. Avrupa kıtası ve Akdeniz'e komşu ülkelerde son iki dekada, insan ve atlarda BNV'nin etken olduğu ağır nöroinvazif hastalık olguları ve salgınlar bildirilmiştir (8).

Ülkemiz komşulukları, vektör aktiviteleri, Asya-Avrupa hattı ve Akdeniz havzasında bulunan yerleşimi ile BNV için endemik sayılan bir bölgede yer almaktadır. Günümüze kadar yapılan serolojik tarama çalışmalarından elde edilen veriler, virüsün ülkemizde bulunduğu ve insanları enfekte ettiğini göstermektedir (9). Yakın geçmişte 2010 yılında Ege bölgesinde Manisa ve çevresinde izlenen BNV salgını, semptomatik ve nöroinvazif olguların varlığını ortaya koymuştur (10).

Ülkemiz'deki varlığı bilinmesine karşın, bölgemizde BNV seroprevalansının gösterildiği hayvanlarda yapılmış olan sınırlı sayıda çalışma mevcut olup, insanlarda yapılmış herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmanın amacı, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörlerinde BNV seroprevalansının araştırılması, gelecekte kan bankacılığında donör taramalarında BNV'nin de dikkate alınması hususunda katkıda bulunulması ve tanı koymakta zorlandığımız klinik vakalarda BNV enfeksiyonlarının akılda tutulmasını sağlamaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

BNV ilk olarak Kuzey Uganda'da ateşli bir hastanın kanından izole edilmiştir (11). 1940'lı yıllar boyunca BNV, Japon Ensefaliti (JE) ve St.Louis ensefaliti (SLE) virüsleri arası yakın antijenik ilişkiler tanımlanmış, laboratuvar koşulları altında, BNV'nin sivrisinekler yoluyla bulaştığı gösterilmiştir (12, 13). Ayrıca Orta Afrika'nın doğusunda yaşayan insanlarda diğer flavivirüsleri ve BNV'yi nötralize eden antikorların varlığı saptanmıştır (14). Mısır'da 1950'li yılların başında sivrisinek, kuş ve insanlarda virüsün varlığı gösterilmiştir (15).

Takip eden 30 yıl boyunca, BNV'nin sivrisinekler yoluyla bulaştığı bilgisi saha kanıtları ile de desteklenmiş, kuşların virüsü yayan konakçılar olduğu gösterilmiştir (16, 17). İsrail ve Güney Afrika'da nadir görülen nöroinvaziv hastalıkla beraber, büyük Batı Nil ateşi epidemileri olmuş, Avrupa ilk defa belgelendirilen Batı Nil ensefaliti salgınını yaşamış ve BNV'nin bir at nöropatojeni olduğu ortaya çıkmıştır (18-21).

İlk zamanlarda düşük patojeniteye sahip bir ajan olarak kabul edilen BNV'nin etken olduğu ve ensefalit olgularının izlendiği epidemiler, 1951-54 ve 1957 yıllarında İsrail, 1962-63 yıllarında Fransa ve 1974 yılında Güney Afrika'da görülmüştür. 1974-1994 yılları arasında BNV enfeksiyonlarına dair major bir epidemiyeye rastlanmazken; 1990'ların ortalarından beri üç önemli salgın bildirilmiştir.

Bunlar;

- 1) İnsanlarda ve atlarda salgın sıklığında artış (Romanya, Morocco 1996; Tunus 1997; İtalya 1998; Rusya, ABD ve İsrail 1999; Fransa, İsrail ve ABD'de 2000 yıllarında).
- 2) İnsanlarda ağır hastalık tablosunda belirgin artış (Romanya'da 393, Rusya'da 942, ABD'de 73, İsrail'de 419 olgu doğrulanmıştır).
- 3) İnsanlarda meydana gelen salgınlarla birlikte özellikle ABD ve İsrail' de çok sayıda kanatlı hayvan ölümleri görülmüştür (22, 23).

1999 yılına kadar BNV'nin coğrafi dağılımı Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan, batı ve orta Avrupa ile sınırlı olmasına karşın; virüs bu yılda Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez saptanmış ve geçen zaman içinde tüm kıtaya hızla yayılarak önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (24). 2002 yılında, ABD tarihinde meydana gelen en büyük arboviral ensefalit salgınına yol açmış, 284 ölüme sebep olmuş ve 4.156 BNV enfeksiyonu doğrulanmıştır. Virüsün Kuzey Amerika kıtasına nasıl geldiği tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte, New York'a uluslararası uçak yolculuğu sırasında taşınan sivrisinekler, ülkeye getirilen ekzotik kuşlar ya da viremili kişiler yoluyla olabileceği düşünülmektedir (25, 26).

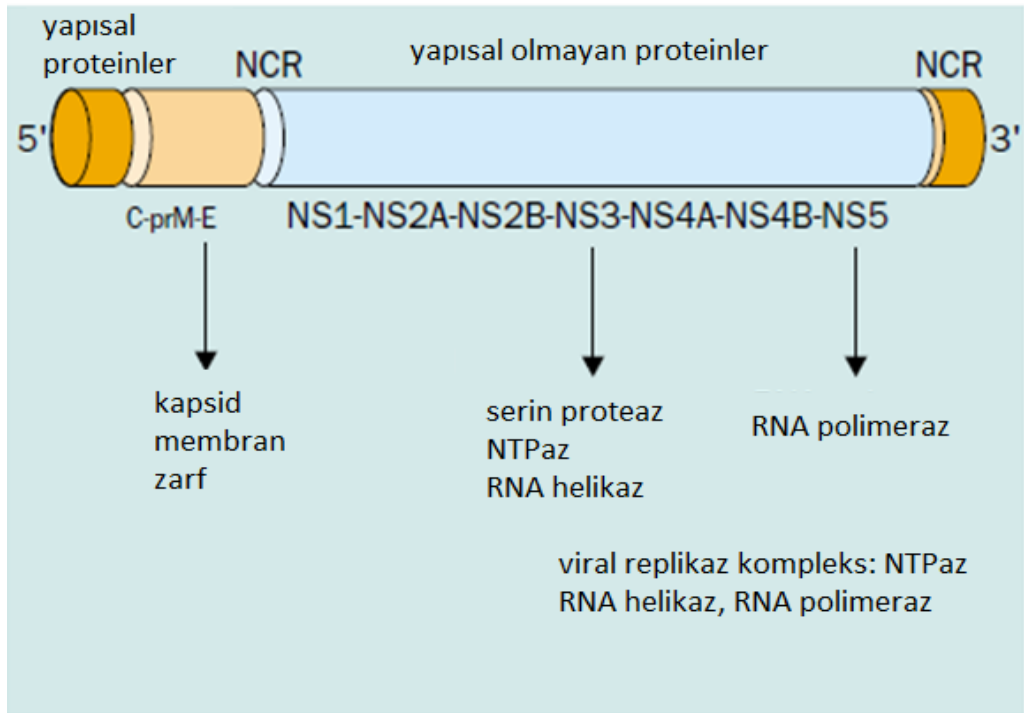
Son dönemde daha önceden diğer konaklarda virüsün varlığı tanımlanmış olan Macaristan ve İtalya'da insan BNV olguları saptanmış; 2010 yılı Temmuz-Ağustos aylarında ise Yunanistan'da ilk kez BNV'nin etken olduğu bir salgın bildirilmiştir (27-29).

Geriye bakıldığında, 1996 Romanya salgını, endüstrileşmiş dünyadaki şehirleşmiş bölgelerde epidemik BNV viral hastalığının ortaya çıkışını işaret eden, ilk salgın gibi görünmektedir (1).

## **2.2. Batı Nil Virüsünün Yapısı, Genomu, Sınıflaması**

BNV, taksonomik olarak *Flaviviridae* familyasının *Flavivirus* cinsinde yer almaktadır (1, 7, 23). Bu ailenin, hepatit C virüsü ve Dengue virüsü gibi önemli patojenlerin olduğu 70 üyesi vardır (30). BNV ve JE virüsü Flavivirus genusu antijenik kompleksi içinde serolojik olarak sınıflandırılmıştır. Bunlar insan

patojenleri olan JE, Murray Valley ensefaliti, SLE ve Kunjin virüsleridir (1, 23). Siferik BNV partikülü yaklaşık 50 nm çapında ve 110.000 nükleotidli tek zincirli pozitif polariteli RNA genomu içeren bir arbovirüstür. Nükleokapsidi çevreleyen konakçı kaynaklı çift kat lipit membrana sahiptir. Virion membranı içine gömülü viral zarf (E) ve membran (M) proteinleri mevcuttur. Bu proteinler; konak yelpazesi, doku tropizmi, replikasyon, immün cevap için B ve T hücrelerinin uyarımı gibi virüse ait önemli özelliklerden sorumludurlar (1, 30). RNA genomu, kısa bir 5' kodlanmayan (non-coding) yaklaşık 100 nükleotidlik bölge ile başlar, takiben, aşağıda sırası belirtilen şekilde, 3 adet yapısal (C, prM ve E) proteini ve 7 adet de yapısal olmayan (Non-structural, NS) proteini kodlayan tek açık okuma çerçevesi içerir. Kapsid-membran-zarf-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' ve 600 nükleotidlik kodlanmayan (non-coding) bölge ile sona erer (şekil 1) (1).



**Şekil 1.** Batı Nil Virüsünün Genomik Yapısı ve Proteinleri (1)



BNV'nin yapısal proteinlerinden C, ana kapsid proteinidir ve genomik RNA'yı bağlar. PreM ise virüsün bir araya gelişi sırasında erken füzyonu önler, ayrıca E proteininin olgunlaşmasına katkıda bulunur. E proteini ise virüsün hedef hücreye tutunması, füzyonu ve bir araya gelmesi aşamalarında görev alır. E ve M proteinleri, virüse karşı B ve T lenfosit yanıtından sorumludur. E proteini ise ayrıca virüsün serotip spesifitesini belirler, viral hemaglutinin özelliği taşır ve nötralizan antikörlerin ana hedefidir (31).

Virüsün yapısal olmayan (non-structural) proteinlerinin ana görevi viral replikasyon, transkripsiyonun düzenlenmesi ile konağın antiviral yanıtının modülasyonudur. Bunlardan NS1, viral replikaz için kofaktör aktivitesi gösterir ve infekte hücrelerden salgılanır. NS2a ise interferon yanıtını baskılar. NS3 proteaz, NTPaz ve helikaz aktivitesine sahiptir (32). NS2B de NS3'ün proteolitik aktivitesi için kofaktör görevi görür. NS4a ve NS4b interferon sinyalizasyonunu modifiye eder ve NS5 RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi ve metil transferazı kodlar (33). Viral replikasyon sitoplazma içerisinde ve kaba endoplazmik retikulum (ER) ile yakın bir ilişki içinde gerçekleşir, sonrasında ise virüs ER lümeni içinde birleştirilir ve hücrenin salgısal organelleri kullanılarak hücreden salınır (34).

Çok sayıda tam uzunlukta genomun nükleik asit sekansı üzerinde yapılan filogenetik analizden elde edilen veriler BNV tiplerinin iki farklı lineage'i (köken) olduğunu göstermiştir. Bunlardan lineage 1, dünya çapında Batı Afrika'dan Orta Doğu'ya, Doğu Avrupa'dan Kuzey Amerika ve Avustralya'ya (Kunjin virüs) kadar olan bir dağılıma sahipken, lineage 2 Afrika'daki enzootik tipleri içerir (35).

Lineage 1'de sınıflandırılan izolatlar farklı subtipler/varyantlar halinde dağılım göstermektedir. Subtip A: Avrupa, Afrika, Orta Doğu ve Amerika, subtip B: Avustralya( Kunjin) virüs, subtip C: Hindistan izolatlarını içermektedir. Lineage 2 ise Sahra altı Afrika ve Madagaskar'da bulunan izolatları içerir. Bilinen iki majör BNV lineage'ine önemli genetik farklılıkları olan 2 yeni lineage eklenmiştir. Bunlardan lineage 3, Çek Cumhuriyeti'nde Avusturya sınırında (Rabensburg virüs olarak adlandırılır) *Culex pipiens* sivrisineklerinden, Lineage 4 ise Kafkasya'da farklı bir virüsten izole edilmiştir (36).

Lineage 1'e bağlı hastalık ve ölümlerin lineage 2'ye göre daha sıklıkla izlenmesi, bu genotipin virulansının daha yüksek olduğu varsayımına yol açmıştır. Lineage 2 ise düşük virulanslı Afrika'ya özgül bir genotip olarak kabul edilmiştir (37).

Fakat yeni çalışmalarla, genotip 2 içinde sınıflandırılan ve bu genotipe ait yüksek patojen virüslerin varlığının da gösterilmesi, bu varsayımların geçersiz olduğunu düşündürmektedir. Güncel bilgiler, her iki ana genotip içerisinde düşük ve yüksek patojen izolatların varlığına işaret etmektedir (38). Patojenitelerindeki farklılığın, virüsün prM, E veya yapısal olmayan proteinlerindeki spesifik bölgeleri kodlayan nükleotidler ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (24).

### 2.3. Virüsün Vektör ve Rezervuarları

BNV'nin doğadaki sivrisinek-kuş-sivrisinek döngüsünde, asıl olarak *Culex* cinsi sivrisinek türleri rol almaktadır. Virüs sadece ABD'nde 29 türden izole edilmiş daha sonraki yıllarda ise bu sayı 43 türe çıkmıştır (1, 3). Fakat farklı türler de virüsün insanlara geçişinde köprü vektörler (bridging vectors) olarak rol alabilmektedirler (39).

Avrupa ve Afrika'da *Cx. pipiens*, *Cx. univittatus* ve *Cx. antennatus*, Hindistan'da *Cx.vishnui complex* başlıca vektörlerdir. Avustralya'da ise Kunjin virüs öncelikle *Cx. Annulirostris* ile iletilir (5).

ABD'de yapılan çalışmalar, 146 kuş türünün BNV ile enfekte olduğunu göstermiştir. Passeriforme takımında yer alan kuşlar (alakarga, karatavuk, ispinoz, çalı bülbülü, serçe, karga) virüsün doğada devamlılığının sağlanmasında önemli görünmektedir. Corvidae aile (kargalar, mavi alakarga) üyeleri önceliklidir. Bu türlerde viremi yüksek düzeyde ve uzun sürelidir. İnsanlar, atlar ve diğer memeliler ise vireminin çok düşük düzeyde ve kısa süreli olması sebebiyle, virüsü sivrisineklere bulaştırmada çok etkili olmamakta, bu nedenle son konak (dead-endhost) olarak kabul edilmektedirler (26, 39).

Sivrisinekler enfeksiyonu viremik bir konaktan beslenerek kazanırlar. Virüs barsak duvarından hemolenfatik sisteme geçerek internal dokuların çoğunda replike

olur. Tükürük bezleri enfekte olan sivrisinek kan emerken virüsü yeni konağa geçirirler. Enfekte kanın alımıyla enfektivite arasındaki döneme extresek inkübasyon dönemi denir. Isıya bağlı değişkenlik göstermekle birlikte bu süre 10-14 gün arasındadır. İnsanlar da dahil memelileri ısırarak ve enfekte eden ornitofilik vektörler köprü vektörler (bridging vectors) olarak adlandırılır (26).

Diğer arbovirüslerle karşılaştırdığında BNV çok geniş bir konak spektrumuna sahiptir. Kuzey Amerika'da 4 yıl içinde, 43 farklı sivrisinek türünde tespit edilmiştir. Çok sayıda sivrisinek türünün vektör olabilmesi sayesinde ABD'de hızla yayılmıştır. 1999 kışı boyunca hayatta kalabilmesi, kışı ergin olarak geçiren *Cx.pipiens* sivrisinek türleri ile olmuştur. *Cx.pipiens* ornitofilik tür olarak bilinmesine rağmen, son çalışmalarda yakın türlerle hibridizasyonun, BNV'nin insan dahil kuş dışındaki diğer konaklara geçişinde katkıda bulunabileceği tespit edilmiştir. ABD'de 2000 yılında kurulan döngü ile BNV, kuşlar tarafından farklı sivrisinek türlerinin bulunduğu alanlara hızla yayılmıştır. Bu durum, virüsün daha fazla sayıda omurgalı türünün olduğu alanlara girmesine fırsat vermiş, konak tercihinde çeşitliliğe sebep olmuştur. Virüsün yıl boyu ergin olarak beslenmelerini sürdüren *Cx quinquefasciatus* gibi konakların olduğu daha ılıman bölgelere girmesi, sürekli canlı kalabilmesini garantilemiştir (3).

Farklı cins ve türlerden yumuşak ve sert keneler BNV ile enfekte olabilmelerine rağmen, BNV iletiminde önemli bir rol oynamaları beklenmemektedir (5). Bununla birlikte, BNV yeni ortamlara girdikçe, yeni artropod türlerini enfekte etme şansının artabileceği akılda tutulmalıdır. BNV Moldavia'da, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus*'dan, Macaristan'da *I.ricinus*'dan izole edilmiş olup, kenelerin endemik alanlarda virüsün devamlılığında rol oynayabileceği, epidemiler sırasında vektöryel öneminin olmadığı düşünülmektedir (40).

BNV için kuşlar, doğal rezervuar olup sadece Kuzey Amerika'da en azından 111 kuş türünün BNV ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (1). Enfekte kuşlar genelde hayatta kalmayı sürdürür ve kalıcı bağışıklık geliştirirler. Ancak bazı kuş türlerinde ölümler kaydedilmiş, özellikle Corvidae ailesi içindeki kuşlara karşı virüsün virülan olduğu belirtilmiştir. 1999 yaz ve sonbahar aylarında meydana gelen BNV salgını, insan ensefalit ve menenjit vakalarının yanı sıra New York, New Jersey ve

Connecticut'da kuş ölümleriyle sonuçlanmıştır. New York Halk Sağlığı Departmanı, %33'ü karga olan 17339 kuş ölümü olgusu bildirmiştir. Bu bulgular bize göstermiştir ki bir BNV salgını öncesinde, kuş ölümlerine dayalı bir gözetim sistemi kurulması, salgın öncesinde BNV varlığının tespitinde hassas bir yöntem olabilir (41).

Virüsün farklı alanlar arasında, göçmen viremik kuşlarla nakli olasıdır. Göçmen kuşlar bu yüzden bahar göçleri sırasında virüsün Avrasya'nın sıcak bölgelerine girmesinde önemli rol oynamaktadırlar (42).

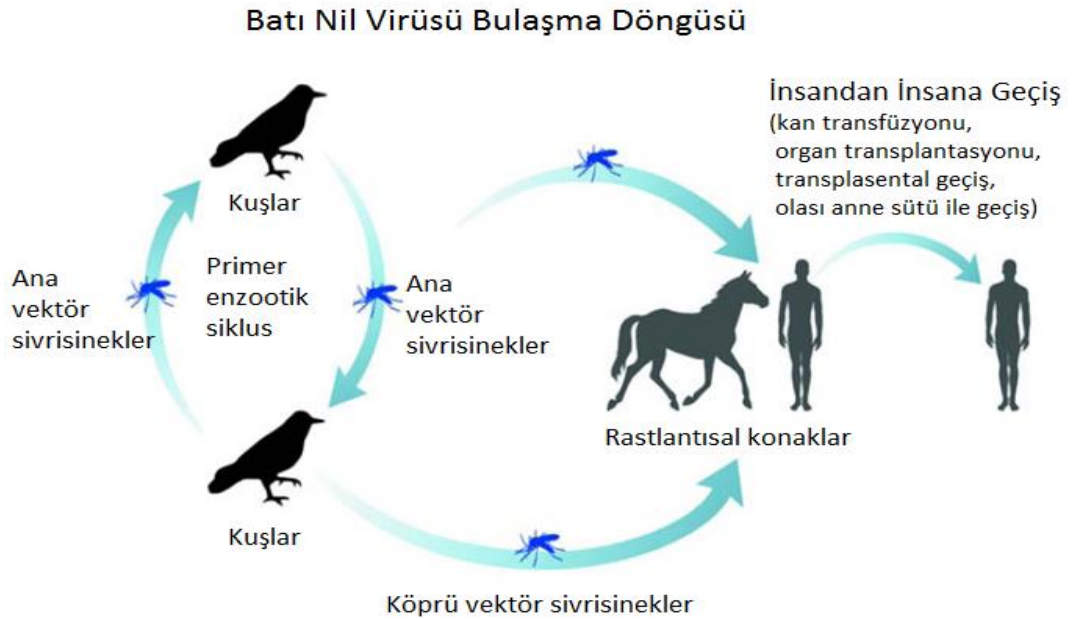
Doğu yarı kürede Akdeniz ve Avrupa ülkeleri arasında düzenli bir nakil söz konusudur. Amerika'da göçmen kuşlarla hareketin ve böyle bir enzootik döngünün varlığı kesin değildir. Fakat, mevsimler boyunca virüsün aktif oluşu, böyle etkili bir kışlama mekanizması olduğuna işaret etmektedir (40).

1999 yılında Amerika'ya giren, Kuzeydoğu Amerika'da varlığını sürdüren BNV özellikle Amerikan kargaları olmak üzere yerli ve ekzotik kuş türlerinde önemli ölçüde mortaliteye sebep olmuştur. 1999 New York suşu ile inoküle edilen tüm kargalar ölmüştür. Kargalar arasında büyük olasılıkla oral yolla direkt geçiş te mevcuttur. İnokülasyon yolu ile enfekte edilen kargaların ölümlerinden önce viremik oldukları ve çeşitli dokularında yüksek titrede virüs varlığı saptanmıştır. 1999 yılı Ağustos-Aralık ayları arasında 262'si Amerikan kargası olmak üzere sahadan toplanan 295 ölü kuşta BNV enfeksiyonu varlığı doğrulanmıştır (41, 43).

Su kuşları ve sulak alanlar çevresindeki kuş popülasyonları içinde yüksek aktivitede BNV sirkülasyonu olduğu da görülmüştür (40).

Birçok memeli türü virüse duyarlı olsa da, doğal hastalık şimdiye kadar yalnızca insan ve atlarda gösterilmiştir. ABD'de 1999-2000 yılları boyunca, birçok memeli türünün (insan, at, kedi, tavşan, kokarca, iki sincap ve iki yarasa türü) doğal olarak enfekte olduğu kaydedilmiştir. Sivrisineklerle raslantısal olarak enfekte olabileceği ileri sürülmüş olan, duyarlı memeli türlerinin BNV bulaşma döngüsü içinde bir rollerinin olup olmadığı belirlenememiştir.

İlk nükleotid dizi analizleri, New York 1999 prototipinin dizisi ile Doğu Amerika kıyılarında bulunan suşların neredeyse aynı olduğunu göstermiştir. Genetik varyantlar ile yapılan son çalışmalara göre, özel bir varyant üzerinde kuvvetli bir seçim yoktur, virüsün Kuzey Amerika'da ilerlerken genetik bir sürüklenmeye uğradığı düşünülmektedir. Bugüne kadar Kuzey Amerika'daki izolatlar arasında herhangi bir fenotipik farklılığın seleksiyonuna dair bir kanıt yoktur. Farklı BNV suşlarının kargalar üzerindeki potansiyel virülans farklılıklarını araştırmak için yapılan çalışmalarına göre; Amerika kargaları (*Corvus brachyrhynchos*), hem Kenya ve Avustralya (Kunjin) eski dünya BNV suşları ile hem de Kuzey Amerika suşu (NY99) ile inoküle edilmiş; NY99 genotipinin kargalarda daha yüksek viremi düzeylerine ve ölüme neden olduğu kaydedilmiştir (40, 44). Bu sonuçlar, BNV'deki genetik değişikliklerin kargalara virulan fenotipten sorumlu olabileceğini ve kargalardaki artmış replikasyonunun BNV'yi Kuzey Amerika'ya yayabileceğini düşündürmektedir (44).



**Şekil 2.** Batı Nil Virüsünün bulaşma döngüsü (25)

## 2.4. Türkiye’de BNV Epidemiyolojisi

Türkiye, BNV için endemik sayılabilecek bir bölgede bulunmaktadır. Vektör kapasitesine sahip çeşitli sivrisinek türlerinin varlığı da bilinmektedir. Anadolu’da insanlarda ve hayvanlarda BNV maruziyeti üç dekattan uzun süredir araştırılmaktadır (9). Ülkemizde insan arbovirüs enfeksiyonlarına ilişkin ilk çalışma, 1964 yılında Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü’nden Heperkan ve Arı tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır’dan toplanan 559 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle antikor araştırılmış, sonuç olarak BNV veya buna benzer bir virüsle meydana gelen bir hastalığın ülkemizde de mevcut olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada yaşın ilerlemesiyle seropozitifliğin arttığı ve olguların bildirim zorunlu hastalıklar arasına alınmasının uygun olacağı da belirtilmiştir (45).

1966 yılında Serter F. tarafından İzmir ve civarında menengial bulgularla gelen hastaların 1/3’ünün viral olduğu ve bunların çoğunluğunun da Arbovirüsler tarafından oluşturulduğu klinik ve laboratuvar kanıtlarıyla bildirmiştir (46). Radda tarafından 1971’de 214 evcil hayvan ve serbest yaşayan fare üzerinde yapılan çalışmada çeşitli artropod kaynaklı virüse karşı antikor araştırılmış ileri doğrulama, virüs nötralizasyon testi ile yapılmıştır. Bu çalışmada BNV maruziyeti koyunlarda Ankara’da 9/45, Hatay’da 1/110 olarak saptanmıştır (9).

İnsanların BNV maruziyetine dair ilk rapor ise Batı Anadolu ve Güneydoğu Anadolu’nun çeşitli illerinde hemaglutinasyon inhibisyon testi kullanılarak antikor aranması için yapılan çalışmalardan gelmiştir (Ari 1972, Meco 1977). Her iki çalışmanın sonuçları virüs nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır. Çalışmalarda elde edilen yüksek oranlar, gruba özgül antikor varlığı şeklinde rapor edilmiştir (9, 47). Bu çalışmalarda elde edilen veriler büyük olasılıkla, Flavivirüsler arasında izlenen ve hemaglutinasyon inhibisyon yöntemi gibi gruba özgül testlerde ortaya çıkan antijenik çapraz reaksiyonlara bağlıdır (48).

1980’de Serter’in Ege bölgesinde insanlarda BNV maruziyetine ilişkin çalışmasında, toplanan serumların 231’inde yani %21.5’inde nötralizan immünglobülinler gösterilmiştir (49).

Özkul ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları Türkiye’yi temsil eden Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa Bursa ve Ankara’yı içeren 10 ilden insanları ve çeşitli hayvanları kapsayan bir seroepidemiolojik çalışmada toplanan 764 serumda BNV’ye karşı gelişen nötralizan antikörlerin varlığı araştırılmıştır. BNV seropozitiflikleri büyükbaş hayvanlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, katırlarda %2.5, insanlarda %20.4 ve koyunlarda 1% oranlarında bildirilmiştir (50).

Sonuç olarak memelilerin büyük çoğunluğunda BNV yada ilişkili bir virüse maruziyet gösterilmiştir. Bu durum aktif hastalık yokluğunda virüsün uzun dönem varlığını sürdürmesine bağlanabilir (9).

Bir başka çalışmada 2007 yılında, seropozitiflik %16 olarak bulunmuş ve bu çalışma sonucunda ülkemizde vektör aktivitesi ile doğru orantılı olarak insanlarda olası BNV enfeksiyonlarının varlığı gösterilmiştir (51). Orta Anadolu bölgesinde yapılan bir çalışmada 2516 kan donöründe seroprevalans %0.56 olarak saptamıştır (52).

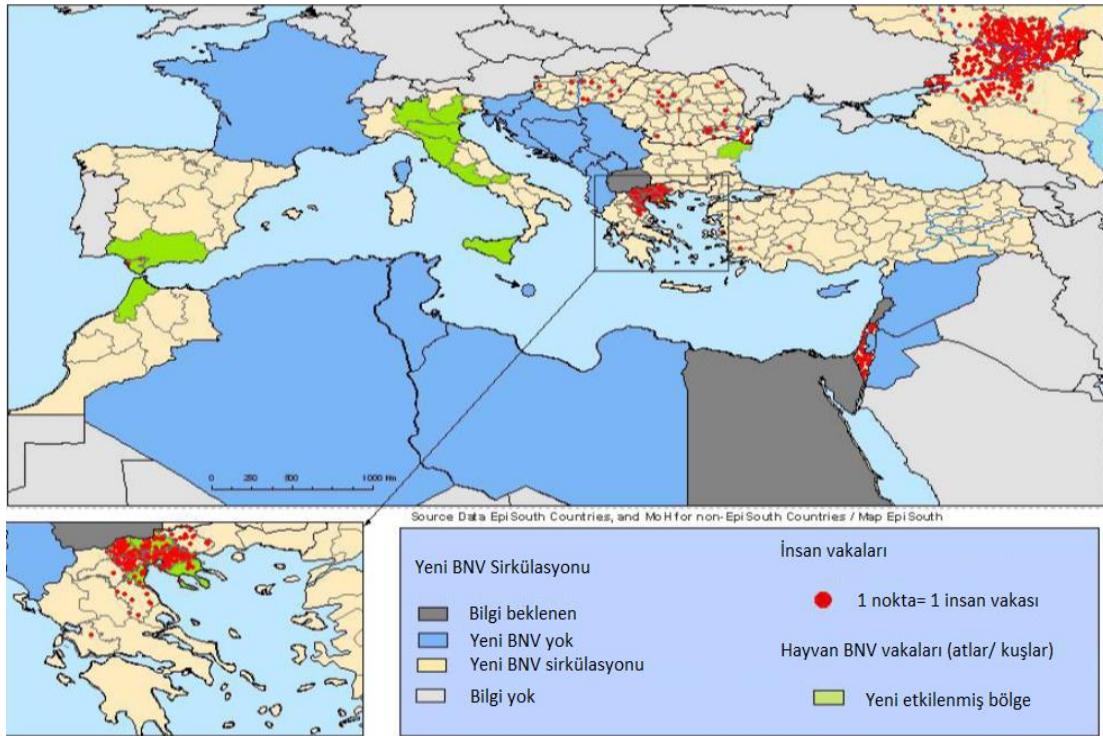
Manisa Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği’nde 2010 yılı Ağustos ayında nedeni açıklanamayan viral ensefalit ön tanılı hastaların laboratuvar tetkikleri “Batı Nil Virüs Enfeksiyonu” tanısı ile sonuçlanmıştır. 08.09.2010 tarihinde yapılan ilk resmi açıklamanın ardından 3’ü ölmüş olan toplam 7 vaka, 14.09.2010 tarihinde Sağlık Bakanlığı tarafından Dünya Sağlık Örgütü’ne bildirilmiştir. Böylece Türkiye’den ilk defa resmi yolla “Batı Nil Virüs Enfeksiyonu” bildirim yapılmıştır (53).

Ülkemizde olduğu gibi komşumuz Yunanistan’da da 2010 Yılı Temmuz başı ile 22 Ağustos ayları arasında Orta Makedonya, Kuzey Yunanistan bölgesinde, yaş ortalaması 70 olan 81 kişide BNV nöroinvaziv hastalığı kaydedilmiştir (29).

Yaz sezonunda (2010 yılı) Yunanistan, Romanya, Türkiye, İsrail ve Rusya’daki olguların yanı sıra Macaristan’da 19 doğrulanmış olgu, İspanya’da atlarda BNV salgınını takiben İtalya’da iki insan olgusu saptanmıştır. 2010’da Yunanistan’da meydana gelen salgın sırasında Avrupa bölgesinde ilk kez BNV lineage 2; kan donörlerinde, *Cx. pipiens* türü sivrisineklerde ve kuşlarda tespit edilmiştir. Tespit edilen suş Macaristan 2004 suşu ile %99.6 oranında benzer

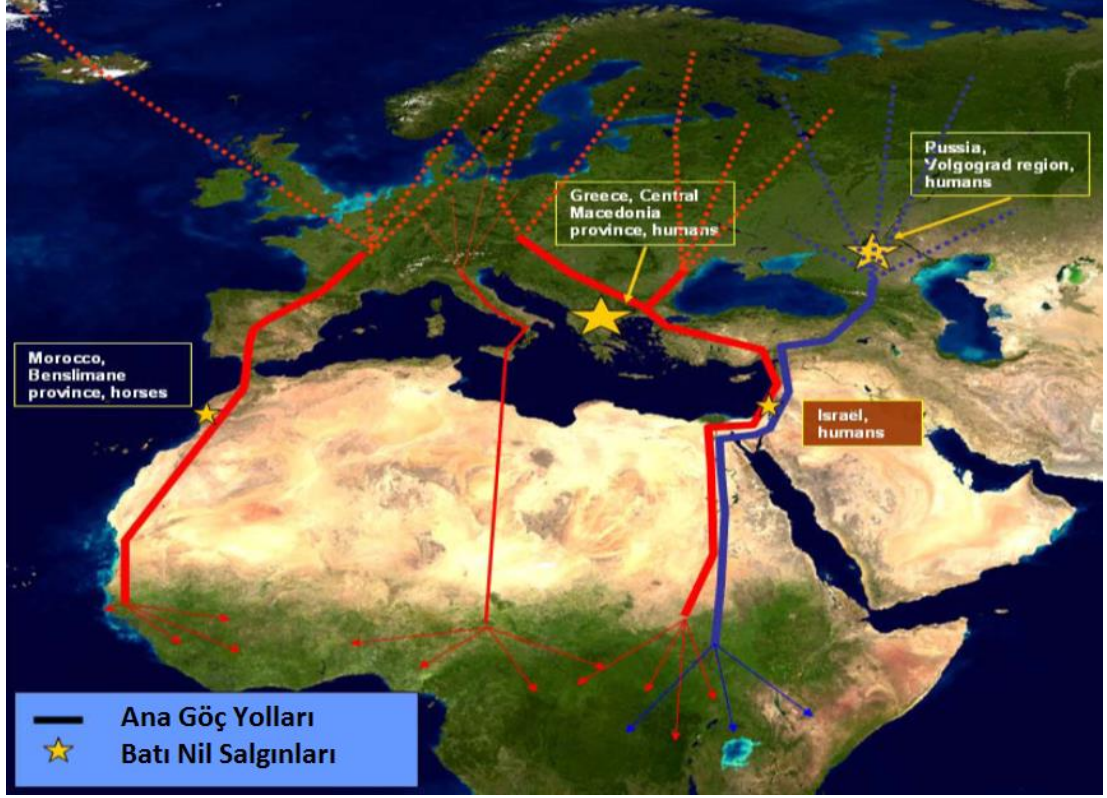
bulunmuştur. Ağustos 2010'daki bu salgında 81'i Batı Nil nöroinvaziv hastalığı, 18'i hafif semptomlu hastalar olmak üzere 99 vaka bildirilmiş, 81 nöroinvaziv vakadan 39'u doğrulanmıştır (29, 54). Romanya'da 49 konfirme olgu; Türkiye'de 35 muhtemel, 12 konfirme olmak üzere toplam 47 olgu ve Rusya'da ise toplam 413 konfirme olgu saptanmıştır.

Bu ülkelerin hepsinde olguların Temmuz-Ekim ayları arasında pik yaptığı saptanmıştır. Yunanistan'da salgın süresinde atlarda BNV IgM antikorları araştırılmış ve %19.5 olarak bulunmuştur. İzmir'de iki atta BNV enfeksiyonu saptanmış ve doğrulanmıştır. Rusya'da Ağustos 2010 'da *Culex* cinsi sivrisineklerin sayısında yıllık ortalamaya göre artış olduğu belirlenmiştir (46).



Şekil 3. Yeni BNV sirkülasyonu olan ülkeler ve komşulukları (Rusya ve Macaristan) (53)





Şekil 4. BNV Salgınları ve Ana Göç Yolları (53)

## 2.5. Bulaşma Yolları

BNV'nin temel bulaşması özellikle *Culex* cinsi sivrisinek ısırığı ile olur; ancak enfeksiyonun insanlara sivrisinek aracılığıyla olmayan yollar (kan/kan ürünlerinin transfüzyonu, organ nakli, diyaliz, intrauterin veya anne sütü, perkütan ve aerosol yol, virüse mesleki maruziyet) ile de bulaşabildiği gösterilmiştir (3-5).

### 2.5.1. Kan Transfüzyonu

BNV kan kaynaklarının güvenilirliğini tehdit eden, transfüzyonla bulaşan önemli patojenlerden biri olarak ortaya çıkmıştır (55). Risk karşılaştırması yapıldığında BNV'nin transfüzyonla bulaşma riskinin HIV ve HCV bulaşma riskinden 2000 kat, HBV bulaşma riskinden 200 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (56).

ABD'de 2002 yılında meydana gelen BNV salgını sırasında, 16 viremik kan donöründen trombosit süspansiyonu, eritrosit süspansiyonu veya plazma alan 23 kişide transfüzyon sonrası bulaş olduğu tespit edilmiştir. Transfüzyon sonrası 2-21 gün içerisinde 15 alıcıda BNV ile ilişkili hastalık gelişmiştir. Düşük viremi seviyesi saptanan bu donörlerin hiç birisinde kan bağışısı sırasında saptanabilir düzeyde BNV IgM bulunmamıştır. Düşük düzeyli ve kısa süreli vireminin görüldüğü asemptomatik enfeksiyonlarda BNV kan ve kan ürünleriyle bulaşabilmekte ve BNV seropozitifliğinin araştırılması bulaşma önlemede yetersiz kalmaktadır (57).

Food and Drug Administration (FDA) kuruluşu 2003 yılında kanların potansiyel kan donörleri açısından taranmasını istemiştir. Bunlar kan bağışısından sonraki 28 gün içinde ateş ve baş ağrısı olanlar olarak tanımlanmıştır. Kan alıp sonra hastalanan kişilere verilen kanların donörleri de taranmıştır. Hastaların ancak %20'sinde semptomlar ortaya çıktığı için bu çalışmalar etkisiz olmuş, daha sonra tarama için nükleik asit testlerinin (NAT) kullanılması gerektiğini vurgulamıştır (58). FDA onayı alan NAT, asemptomatik viremik donörlerin taranmasında kullanılmaya başlanmıştır. ABD'de 2003 yılı Haziran ayı sonu Eylül ayı ortaları arasında tüm sivil kan bağışları BNV için taranmıştır. 2.5 milyon kan bağışının 489'unda NAT reaktif saptanmış, viremik kan bağışçısı olarak değerlendirilmiştir. Viremik donörlerin yaklaşık %90'ı asemptomatik olup sadece iki kişide BNV ilişkili

meningoensefalit gelişmiştir. Bu enfekte kan ürünlerinin gözden kaçırılmasının sebebinin düşük viremi seviyesine mi yoksa test etkinliğine mi bağlı olduğu bilinmemektedir. BNV enfeksiyonunun sık olduğu bölgelerde vericiler doğrudan NAT ile taranabilir (59, 60).

### **2.5.2. Organ Nakli**

Ağustos 2002'de ortak bir donörden organ nakli yapılan 4 kişide ateş saptanmış, 3'ünde meningoensefalit kliniği gelişmiştir. Dört alıcıda da BNV enfeksiyon tanısı konulmuştur. Organ donöründen alınan serum ve plazma örneklerinde PCR yöntemi ile BNV tespit edilmiştir. Organ donörü daha önce 63 vericiden kan almış ve daha ileri araştırmalarda kan verenlerin bağış sırasında viremik olduğu bulunmuştur (61).

### **2.5.3. Emzirme**

Ekim 2002 de post partum kanama nedeniyle bir kadın hastaya kan transfüzyonu yapılmış ve hastada meningoensefalit gelişmiştir. Hastada BOS'da BNV spesifik IgM pozitif olarak bulunmuştur. Hasta bebeğini emzirmiş ve doğumdan 16 gün sonra alınan süt örneğinde PCR ile BNV tespit edilmiş, süt BNV IgG ve IgM açısından pozitif bulunmuştur. Yeni doğan afebril ve sağlıklı olarak kalmıştır ancak bebekten 25. günde alınan serumda BNV IgM pozitif bulunmuştur. Bebeğin çok az dış ortamda kalması ve diğer sivrisinek kaynaklarından uzak olması anne sütünün enfeksiyon kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Bu bilgiye rağmen anne sütünün faydalarından dolayı süt kesilmemelidir (62).

### **2.5.4. Transplasental Geçiş**

Yine Ağustos 2002'de 20 yaşında gebe acile BNV meningoensefaliti ile uyumlu semptomlarla başvurmuş; BOS ve serum örneklerinde BNV IgM pozitif bulunmuştur. Hasta 5 hafta sonra doğum yapmış, yenidoğanda serolojik olarak BNV enfeksiyonu kanıtlamış, bilateral koryoretinit ve MRI'da temporal ve oksipital loblarda beyaz cevher kaybı gözlenmiştir. Gebeler bu açıdan BNV ve diğer sivrisinek kaynaklı bulaşlar açısından önlem alınarak izlenmelidir. Şüpheli durumlarda gebe hemen taramaya alınmalıdır. Asemptomatik gebelerde veya

yenidoğanlarda ise tarama testleri tavsiye edilmemektedir. Çünkü enfeksiyonun tedavisi için özel bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. BNV antikoru 1 yıl süreyle pozitif kaldığından enfeksiyonun ne zaman geliştiği tam olarak kestirilememektedir (63).

#### **2.5.5. Laboratuvardan Bulaş**

İki laboratuvar çalışanı 2002 yılında otopsi sırasında el yaralanması sonucunda enfekte olmuş, her iki hastada da başka bir risk faktörü saptanmamıştır. Hastalık hafif kendi kendini sınırlayan bir seyir göstermiş ve tamamen iyileşmiştir. Laboratuvar çalışanları özellikle salgın dönemlerinde yüksek risk altındadırlar. Kesinlikle önlem alınarak çalışılmalıdır (7).

#### **2.6. Patogenez ve Patoloji**

Vakaların büyük çoğunluğunun asemptomatik veya subklinik seyretmesi ve laboratuvar tarafından doğrulanmış insan olgu sayısının azlığı nedeniyle insanlardaki BNV patogenezini tam olarak anlamak zordur. Daha çok rodent modelleri BNV yayılım ve patogenez mekanizmasına ışık tutmuştur (33).

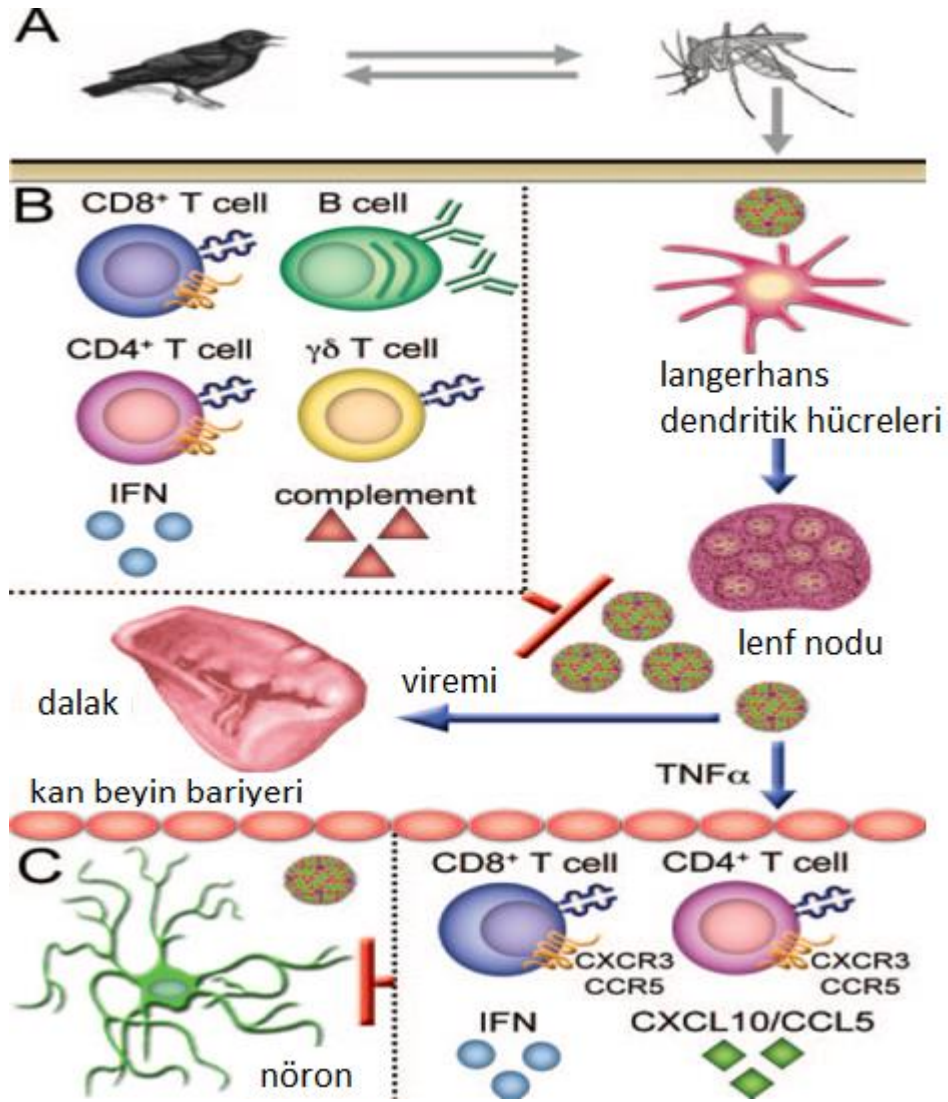
BNV enfeksiyonu flavivirüs benzeri patogenez gösterir. Virüs replikasyonu ve yayılmasında konakçı ve vektör ilişkisi önemli yer tutar ve vektörlerin çoğunda patolojik değişiklik yapmaz. Sivrisinekler beslenmek amacıyla infekte konakçıdan kanı emerler. Kan yolu ile alınan virüs ilk olarak sivrisineklerin mesenteriyal epitel hücrelerini enfekte eder ve çoğalır. Daha sonra tükruk bezlerinde çoğalmaya devam ederek buradan konakçıya ısırma-sokma yolu ile subkutan olarak girer (64).

Periferal inokülasyonu takiben ilk replikasyon yeri subkutan Langerhans dendritik hücreleridir. Bu hücreler lenf nodlarına direne olur (33). Dendritik hücreler bölgesel lenf düğümlerini infekte ederken interferon tip 1 ve tip 2 salgılayarak kontagiyöz yayılmayı sınırlandırır. Enfekte lenf düğümlerinde virüs makrofajlar, B hücreleri, folikuler dendritik hücrelerin yer aldığı hücrelerde replike olur. Daha sonra enfeksiyöz virüs afferent kanallara çıkar ve torasik kanal aracılığıyla dolaşıma katılarak primer viremi oluşturur (64). Viremi vücuttaki dalak, böbrek gibi periferal dokuların enfeksiyonu ile sonuçlanır (33). Viremi birkaç günde sona erer ve bu

durum tipik olarak BNV IgM antikorlarının oluşmasıyla sonuçlanır (46). Viremi esnasında bir çok ekstrasöral doku hematojen yolla virüs tarafından enfekte edilir ve bu dokulardan virüsün salınımı viremiyi devam ettirir (64).

Virüsün MSS'ne penetrasyonu toll-like resptörlerin uyarılmasını, kan beyin bariyeri permeabilitesini artıran TNF- $\alpha$ 'nın artışını takiben olmaktadır. BNV özellikle beyin derin çekirdeklerinde, gri cevherinde, beyin sapında ve spinal kordda nöronları direkt olarak enfekte eder. By-stander sinir hücrelerinin kollateral destrüksiyonu paralizye katkıda bulunur. Ölümcül olmayan BNV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu konak immün yanıtı ile temizlenebilmesine rağmen virüs bazı vertebralı konaklarda kalıcı olabilmektedir (24).

Virüs sinir sistemine ulaştığı dönemde hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve erimeye, dokularda yangıya neden olur. Virüsün beyine girişi, viremik faz sırasındadır. Ölümcül BNV enfeksiyonunun patolojik bulguları beyinde yaygın bir yangı ve spinal kordonda küçük hemorajilerle yaygın bir nöronal dejenarasyondur. BNV enfeksiyonunda şekillenen meningoensefalitten ölen dört hastanın postmortem patolojik bulgularının perivasküler ve leptomeningial kronik bir yangı, mikroglial nodüller, özellikle temporal loplara ve beyin alt taraflarını içine alan nöronofaji şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bu bulguların polio benzeri paralizye sahip hastaların spinal kordonlarında da göze çarptığı vurgulanmıştır (64).



Şekil 5. Batı Nil Virüsü yayılması ve bağışıklık sistemi kontrolü (33)

## 2.7. Klinik

İnsanlarda semptomatik BNV enfeksiyonunun klinik spektrumu kuzey ABD epidemisi sırasında daha iyi tanımlanmıştır. İnsanlardaki BNV enfeksiyonunun %80'i asemptomatik seyretmektedir. Semptom gelişenlerin çoğunda kendi kendini sınırlayan Batı Nil Ateşi olarak isimlendirilen hafif ateşli bir klinik tablo gelişir. Semptomlar akut başlangıçlı ateşle birlikte baş ağrısı, yorgunluk, halsizlik, kas ağrısı ve güçsüzlükle karakterizedir. Gastrointestinal semptomlar, gövde ve ekstremitelerde

geçici makülopapüler döküntüler de rapor edilmiştir. Hastalarda yaygın lenfadenopatide sık rastlanan bir bulgudur (7, 24).

Yakın zamanda yapılmış bir takip çalışmasına göre konsantrasyon bozukluğu ve boyun ağrısı yada sertliği ayrıca önemli semptomlar olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 98 hastanın %31'i hastaneye yatırılmış, %79'u hastalığı nedeniyle okula yada işe gidememiş ve tamamen iyileşene kadar geçen süre ortalama 60 gün olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki nörolojik semptomlar olmadan dahi BNV enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı problemine neden olabilmektedir (24).

İnsanlarda BNV enfeksiyonlarının inkübasyon periyodu 2-15 gün arasında değişmektedir (genel periyod 2-6 gündür) (7).

İnsanlarda klinik tablo asemptomatik enfeksiyondan sekelle sonuçlanan ciddi nörolojik hastalıklara kadar değişmektedir. Seroepidemiolojik çalışmalar; BNV ile enfekte her 150-300 insandan yaklaşık 30'unda Batı Nil Ateşi geliştiğini, 1'inde ise ciddi nörolojik hastalık tablosunun oluştuğunu bildirmektedir (55).

BNV enfeksiyonlarından nöroinvazif hastalık, semptomatik enfeksiyonlar içerisinde göreceli olarak daha az sıklıkta meydana gelmekte; genellikle menenjit, ensefalit veya poliomyelit benzeri paralizi şeklinde semptom vermektedir. Bunun dışında daha nadir olmakla birlikte duyu bozuklukları, tremor/Parkinsonizm, ataksi, kraniyal sinir bulguları, optik nörit ve poliradikülopati de tanımlanmıştır. Merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonu olarak rapor edilen olgu sayısı; bu enfeksiyonların kayıt altına alınması, semptomların daha belirgin olması ve sağlık kuruluşlarına başvurma durumunun daha sık olması nedeniyle daha fazla olabilmektedir (65).

İleri yaş enfeksiyon sonrası gelişen ciddi nörolojik hastalık açısından en anlamlı risk faktörüdür; 50 yaş ve üstü kişilerde risk belirgin şekilde artar. 1999 New York salgını sırasındaki atak oranlarının analizi göstermiştir ki ciddi nörolojik hastalık insidansı 0-19 yaş arası kişilerle kıyaslandığında, 50-59 yaş arası kişilerde 10 kat ve 80 yaş ve üstü kişilerde 43 kat daha fazla bulunmuştur (66). Erişkinleri ve ileri yaştakileri etkilemesi, ensefalit olgularının %10'unun ölümle sonlanması BNV enfeksiyonlarının önemli bir özelliğidir (67).

İleri yaş ve organ transplantasyon sonrası immüsupresyon dışında ağır nöroinvaziv BNV hastalığı için başka risk faktörleri henüz tanımlanmamıştır. Altta yatan hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, diyabet olası predispozan faktörler olarak düşünülebilir. Ağır hastalık için genetik yatkınlık farelerde tanımlanmış olmakla birlikte henüz insanlarda açığa kavuşturulamamıştır (5).

BNV enfeksiyonlarında hepatit, pankreatit, miyokardit, pnömoni, rabdomiyoliz, orşit, koryoretinit gibi nörolojik olmayan bulgular da ortaya çıkabilmektedir. Kuzey Amerika'da bazı hastalarda kardiyak disritmi de saptanan bulgular arasındadır (24, 65).

## **2.8. Batı Nil Ateşi Vaka Tanımı**

### **2.8.1. ICD 10 Tanı Kodu: A92.3**

### **2.8.2. Klinik kriterler**

Başka bir nedenle açıklanamayan ensefalit tablolarında BNV de etken olarak düşünülmelidir. BNV menenjit, ensefalit veya meningoensefalite neden olabilir. Asemptomatik olarak da geçirilebilmektedir.

### **2.8.3. Laboratuvar kriterleri**

Laboratuvar tarafından kesin vaka tanısı için aşağıdakilerden herhangi birinin pozitif olması:

- Kandan veya BOS'tan BNV'nin izolasyonu
- Kanda veya BOS'ta BNV nükleik asidinin tespiti
- BOS'tan BNV spesifik (IgM) antikor cevabı
- Kanda, BNV yüksek IgM titresi ve BNV IgG tespiti ve konvalesan dönemde 4 katlık artışın gösterilmesi veya IgM ve IgG'nin nötralizasyonla doğrulanması.



Laboratuvar tarafından şüpheli vaka tanısı için:

Serumda BNV spesifik IgM ve yüksek titrede IgG antikor cevabının gösterilmesi. (Antikorlar arası çapraz reaksiyon olduğu için tek başına antikor cevabı şüpheli karşılanmalıdır).

Laboratuvar sonuçları değerlendirilirken diğer flavivirüs ve arbovirüs ailesi içerisinde yer alan etkenlere yönelik aşılama yapılmışsa çapraz reaksiyon açısından göz önüne alınarak yorumlanmalıdır.

#### **2.8.4. Epidemiyolojik kriterler**

Aşağıdakilerden en az birinin olması

- Hayvandan insana bulaş (BNV'nin endemik olduğu, at veya kuşlarda geçişinin gösterildiği bölgelerde iken sivrisinek ısırıklarına maruz kalmak)
- İnsandan insana bulaş (vertikal bulaş, kan transfüzyonu, transplantasyon)

#### **2.8.5. Vaka sınıflaması**

Olası vaka:

Ensefalit bulgusu olan bir vakada aşağıdakilerden en az birinin olması,

- Epidemiyolojik bağlantı
- Olası vaka için laboratuvar testlerinin pozitif olması.

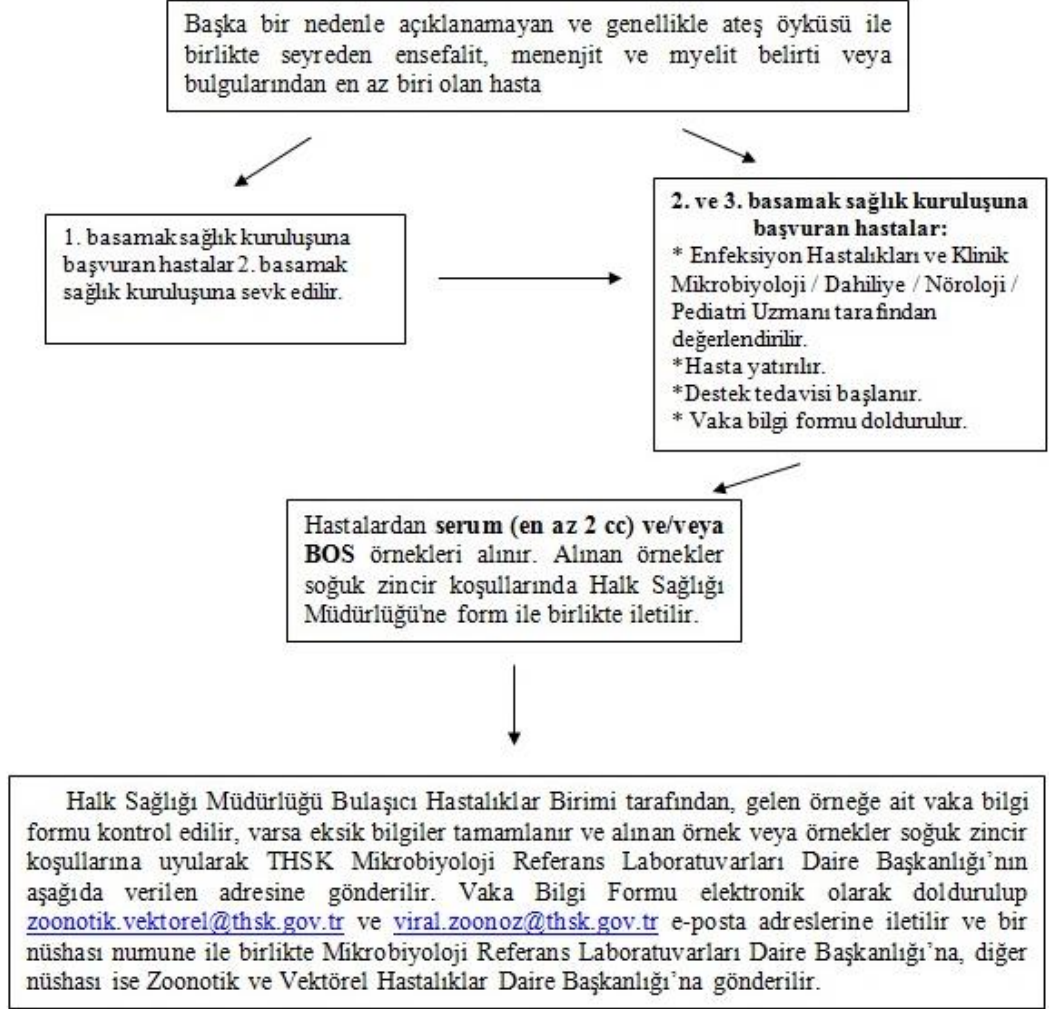
Kesin vaka:

Laboratuvar tarafından kesin vaka konfirmasyonunun gösterilmesi.

#### **2.8.6. Bildirim şekli**

Sentinel olarak (C Grubu) belirlenecek laboratuvarlardan kesin vakalar en hızlı iletişim aracı ile ivedilikle bildirilir (53).

**Batı Nil Virüs Enfeksiyonları  
Vaka Yönetim Algoritması Ve Örnek Gönderme Kriterleri**



**Şekil 6.** Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı BNV enfeksiyonları vaka yönetim algoritması ve örnek gönderme kriterleri (68)

## 2.9. Tanı

Tanı, klinik şüphe ve spesifik laboratuvar testlerinin sonuçlarına dayanmaktadır. BNV enzootik aktivitesi veya yerel insan vakalarının varlığı durumunda klinik şüphe daha da yükselmelidir. Yaz sonu veya sonbaharın erken dönemlerinde yada sıcak iklime sahip yerlerde yılın herhangi bir döneminde ateş, baş ağrısı, kas güçsüzlüğü, eritematöz döküntüsü olan açıklanamayan ensefalit veya menenjit bulguları mevcut hastalarda BNV enfeksiyonu akılda tutulmalıdır. Tam kan sayımı, BNV için serolojik testler, BOS da hücre sayımı, glukoz ve protein düzeyi tetkikleri ve endikasyonu varsa, nörolojik görüntüleme ve elektrodiagnostik yöntemler ilk yapılacak laboratuvar testleri olmalıdır (25, 66).

Rutin klinik laboratuvar testleri BNV enfeksiyonunun birçok viral enfeksiyondan ayrımını yapamamaktadır. BNV enfeksiyonlarının tanısında genel olarak virüsün izolasyonu, viral antijenler ya da nükleik asidin saptanması ve virüse karşı oluşan özgül immün yanıt gösterilmeye çalışılmaktadır. Hücre kültürlerinde üretilen diğer virüslerde olduğu gibi virüsün izolasyonu, BNV için de altın standart yöntemdir. Fakat yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar dışında, insanlarda gelişen viremi düşük düzeydedir ve bu nedenle izolasyon çalışmaları genellikle olumlu sonuç vermemektedir (24, 69).

Hastalarda hafif lökositoz veya lökopeni saptanabilir. Özellikle ensefalitli hastalarda olmak üzere hafif düzeyde hiponatremi bazı hastalarda saptanabilir. BNV meningoensefalitli hastaların BOS'larında hafif lenfosit ağırlıklı pleositoz, hafif-orta düzeyde protein artışı ve normal glukoz seviyeleri olabilir (7, 59).

Eğer örnekler uzun süre saklanacak ise, canlı virüs ve nükleik asit miktarını düşürmemek için  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklanmalıdır (70). Sadece antikor bakılacak örnekler ise oda sıcaklığında 48 saat saklanabilir. Virüs immünkompetan ateşli hastaların kanlarında 10 gün ve altındaki sürelerde, immünsüprese hastaların kanlarında ise enfeksiyonun 22-28 gün sonrasına kadar izole edilebilmektedir.

Viremi 4-8. günlerde pik yapmakla birlikte, düşük titrelerde ( $10^3/\text{mL}$ ) saptanabilmektedir. Gaita, idrar ve boğaz sürüntü örneklerinden virüs izole edilememiştir. BNV'ye bağlı MSS enfeksiyonu tanısı seroloji, polimeraz zincir

reaksiyonu (PCR), BOS'dan virüs izolasyonu ve beyin biyopsi dokusundan immünohistokimyasal (IHK) testler ile konulur. Bu testlerden PCR veya BNV spesifik IgM, kan veya BOS örneklerinden çalışılabilir. Fakat serolojik ve immünohistokimyasal sonuçlar diğer flavivirüsler ile çapraz reaksiyon olabilmesi nedeniyle yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle pozitif IgM sonuçları plak redüksiyon nötralizasyon antikor testi (PRNT) ile doğrulanmalıdır. BNV'ye karşı oluşan antikor titresini enzim immünassay (EIA), kompleman fiksasyon, nötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri ile gösterilebilir. İmmünohistokimyasal testte nekropski ve formalinle sabitlenmiş biyopsi materyalleri kullanılmaktadır.

1. EIA ile serum IgM titresinde akut ve konvelesan dönem arasında 4 katlık titre artışı.
2. Doku, kan, BOS veya diğer vücut sıvılarından virüsün izolasyonu, viral genin veya antijenin bu örneklerden tespit edilmesi.
3. EIA sonucunun PRNT ile doğrulanmasıyla BOS veya serumdan BNV spesifik IgM antikorunun tespit edilmesi gibi, sayılan bulgulardan en az biri ile BNV enfeksiyonu doğrulanmalıdır (71).

### **2.9.1. Serolojik testler**

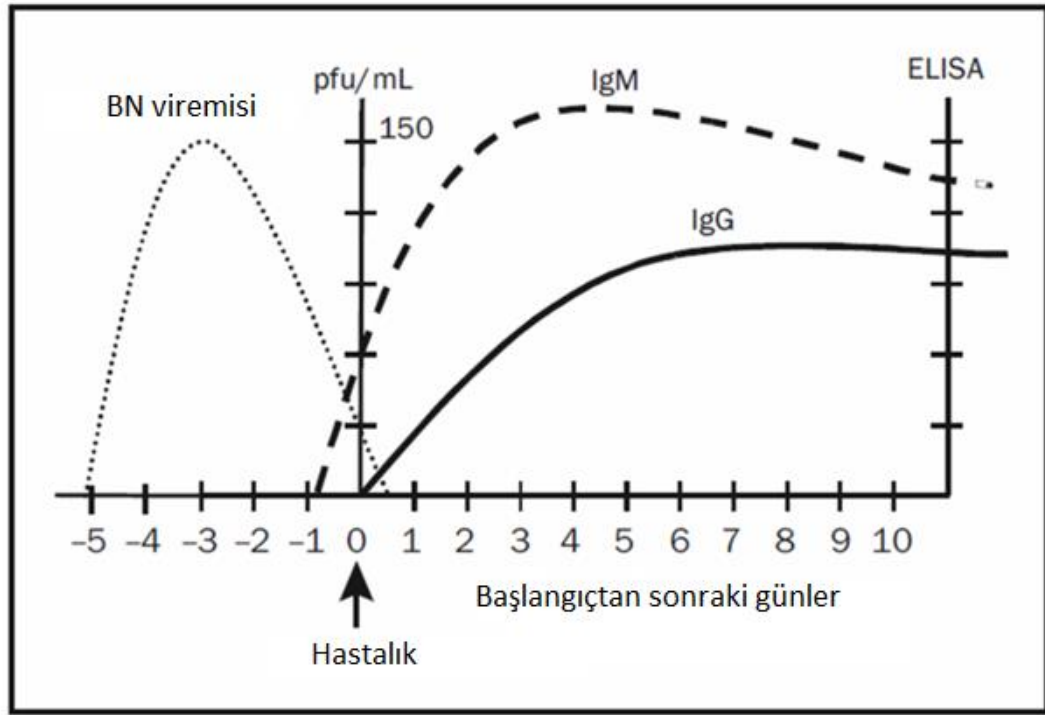
BNV'ye bağlı enfeksiyonların teşhisinde sıklıkla serolojik inceleme yöntemleri kullanılmaktadır (72). BNV antikorlarının saptanması için IgM-antikor yakalama enzim immünoassay (MAC-ELISA), indirekt IgG ELISA, indirekt fluoresan antikor testi (IFAT), plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Hemaglutinasyon inhibisyon ve kompleman birleşmesi gibi testler ise gruba özgül ve total antikorları tespit etmeleri, duyarlılıklarının daha düşük olması nedeniyle kullanımları yaygın değildir. ELISA ve IFAT yöntemlerine dayanan farklı testler geliştirilmiş olmakla birlikte antijen kaynağı ve test platformuna bağlı olarak duyarlılık ve özgüllükleri farklılıklar göstermektedir. PRNT yöntemi ise, virüsün hücre kültürlerinde oluşturduğu sitopatik etkinin önlenmesi esasına dayalı, antikor özgüllüğünün belirlenmesinde kullanılan bir doğrulama testidir. Klinik olarak BNV düşünülen vakaların serum ya da BOS örneklerinde

MAC-ELISA yöntemi ile IgM antikorlarının saptanması, akut BNV enfeksiyonunu gösteren önemli bir bulgu olarak kabul edilmektedir (24, 38, 73).

Semptomatik olan BNV enfeksiyonlarının büyük bir kısmında 2-8 gün sonrasında IgM antikorları pozitif olarak saptanmaktadır, 2 hafta yüksek düzeyde seyrettikten sonra birkaç hafta yada ay içerisinde kaybolmaktadır. MSS tutulumu olan olgularda ise nörolojik bulguların ortaya çıktığı dönemde genellikle IgM antikorları da pozitiftir. IgG türü antikorlar ise IgM'nin ardından yaklaşık 7. günde ortaya çıkmakta, 7-21 gün arasında artarak enfeksiyondan 3 hafta sonra tespit edilebilmekte ve uzun yıllar kalıcı olmaktadır. IgA antikorları da IgM ile benzer zamanlarda ortaya çıkar (7, 24, 74, 75). Lomber ponksiyon sırasında kan kontaminasyonu olmamış ya da kan-beyin bariyeri bozulmamışsa BOS'ta IgM antikorlarının saptanması, enfeksiyon lehine bir bulgu olarak yorumlanmalıdır. IgG antikorları için daha sık olmak üzere flavivirüsler ve aynı serogrup üyeleri arasında antijenik benzerliğe bağlı olarak izlenen çapraz reaksiyonlar PRNT yöntemi ile ekarte edilebilmektedir (38).

Enfekte kişilerde serumda IgM ve IgA antikorlarının ve BOS'da IgM antikorlarının uzun süreler varlığını devam ettirerek tanısal testlerde reaktif sonuç verdikleri ortaya konulmuştur. Serumda IgM ve IgA antikorlarının özellikle ilk 200 gün boyunca persistans gösterebildiği, ayrıca IgM antikorlarının 12 ayı aşacak süreler pozitifliğini sürdürebildiği de saptanmıştır (75).

IgG avidite testleri ya da akut ve konvelesan dönemde alınan serumlarda nötralizan antikor titre artışının PRNT ile saptanması ise akut enfeksiyonların önceki maruziyetlerden ayrılması amacıyla uygulanmaktadır (76).



Şekil 7. BNV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında seroloji (7)

Sonuç olarak BNV’de serolojik testlerin doğru olarak yorumlanabilmesi için, enfeksiyonun bölgesel epidemiyolojisi, kişinin önceden geçirdiği Flaviviral enfeksiyonlar ve aşılamalar, endemik bölgelere seyahat öyküsü gibi çeşitli faktörler test sonuçları ile birlikte değerlendirilmeli; tanı klinik bulgular ve doğrulama testleri ile desteklenmelidir (24, 46).

### 2.9.2. Moleküler testler

Viral RNA’nın Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemiyle saptanması BNV enfeksiyonu tanısında ve tarama amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılan tekniğe göre değişiklik göstermekle birlikte, Viral RNA’nın saptanması, genel olarak analitik duyarlılığı çok yüksek bir tanı metodudur. Ayrıca, yöntemle göre kantitatif sonuç elde edilmesi de mümkündür. Ancak, özellikle insanlarda gelişen BNV enfeksiyonlarında vireminin erken dönemde ve kısa süreli olması; immün yanıtın ortaya çıkmasıyla birlikte azalarak ortadan kalkması nedeniyle nükleik asit testlerinin tanı etkinliği genellikle virüse maruziyetin

genellikle ilk 7 günöyle sınırlı olmaktadır. Fakat viral RNA'nın da uzun süreli persistansı BNV ile enfeksiyon geçirmiş kişilerin bazılarında ve hayvan deneylerinde gösterilmiştir.

Ayrıca virüsteki genetik çeşitliliğe bağılı olarak ya da primer/prob bağlanma dizilerinde mutasyon bulunan izolatlarda, nükleik asit testlerinin etkinlik ve duyarlılıkları değişmektedir. Nükleik asit testleri, kan donörlerinin viremi açısından taranması amacıyla da kullanılmaktadır (38, 74, 77).

### **2.9.3. Virüs izolasyonu**

Tanıda altın standart virüsün izolasyonu olmakla birlikte, yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar dışında, insanlarda ortaya çıkan viremi düşük düzeyde olup kısa sürede temizlendiğı için virüs izolasyon çalışmaları genellikle başarılı olmamaktadır (39). Virüs, laboratuvar ortamında fare yavrularının beyinlerine inoküle edilerek yada sivrisinek ve diğere memelilerin devamlı hücrelerinde üretilebilir. BNV için 3. seviye emniyetli labotuarlar uygundur. Laboratuvar kaynaklı sadece bir vaka (aerosol yoldan) bildirilmiştir (71).

### **2.9.4. Antijen testleri**

Kanatlılar ve sineklerde viral antijenlerin saptandığı tarama çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilen farklı yöntem ve duyarlılıklara sahip çeşitli ticari test sistemleridir (VecTest™, RAMP™)(38). VecTest BNV antijen testi enfekte sivrisineklerde BNV'nin niteliksel tayinini amaçlayan hızlı bir immuno kromatografik testtir. Vectest antijen analizi, ticari olarak bulunabilen, dip-stick formatında koloidal golda çekilen, türe spesifik monoklonal antikorları kullanan sivrisinek havuzlarında arbovirus antijeninin varlığını göstermek için kullanılan testlerdir (38, 78).

### **2.10. Tedavi**

BNV enfeksiyonunun bilinen spesifik bir tedavisi yoktur. Başlıca tedavi destekleyici tedavi şeklinde olmalıdır. BNV ensefalitinde en sık ölüm sebebi nöron dejenerasyonu ve ölümü sonucu gelişen serebral ödemdir. Meydana gelen ödemi veya hasarı önleyen spesifik bir tedavi yoktur. Hücre kültür sistemlerinde yapılan

çalışmalarda ribavirinin potansiyel faydalı olduğu bulunmasına rağmen, invivo diğer flavivirüsler ile yapılan çalışmalarda etkisi gösterilememiştir. Hastalarda solunum desteği, serebral ödem kontrol edilmesi ve gelişebilecek sekonder infeksiyonların önlenmesi gibi destek tedaviler uygulanmalıdır. Steroid ve mannitol gibi osmotik solüsyonlar bazı olgularda beyin ödemi azalttığı için beyin ödemi ve herniasyon tedavisinde kısa süreli kullanımları önerilmektedir. Fakat BNV ensefalitinde bu solüsyonların proflaktik kullanılması gerektiğine ilişkin kontrollü bir çalışma yoktur (70).

BNV ensefaliti olan hastalar hastaneye yatırılmalı ve tedavi edilebilir santral sinir sistemi lezyonları ortadan kaldırılmalıdır. Olgular, nöroloji, enfeksiyon hastalıkları, yoğun bakım hekimleri ve gerektiğinde psikiyatrist ile birlikte izlenmelidir. Hastaneye yatırılan hastalarda sıvı-elektrolit dengesi sağlanması amacıyla İV sıvı verilmesi, solunum yetersizliği varsa ventilatör desteği yapılması, serebral ödem takibi ve tedavisi, konvülsiyonlar açısından takip ve gerekirse tedavi ayrıca duyu kaybı ile birlikte olan ve olmayan motor paralizi açısından değerlendirmeler yapılmalıdır. Analjezikler ve antipiretikler hastalığın ılımlı seyrettiği durumlarda yararlı olabilir (46).

Odelola ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, virüs inokülasyonundan sonra intraperitoneal olarak 1.5 mg ribavirin uygulanması sonucu BNV ile enfekte farede sağ kalma oranı %83, kontrol grubunda ise %25 olarak saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise in-vitro insan oligodendroglial hücrelerine uygulanan yüksek doz ribavirinin BNV'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Alfa ve beta interferonun fare modelinde BNV'ye karşı koruyucu olduğu görölmüştür. İnterferon alfa-2b koruyucu ve tedavi edici bulunmuştur. İnterferon alfa-2b hücreye BNV ile enfekte olmadan önce veya sonra uygulandığında düşük dozda viral sitotoksisteyi inhibe etmektedir. Aynı zamanda tedavi edici etkisinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ribavirin in vitro olarak koruyucu bulunmuş ama tedavi edici etkisinin olmadığı bildirilmiştir. İnterferon alfa-2b, in-vitro olarak ribavirinden daha fazla tedavi edici aktiviteye sahiptir. HCV tedavisinde olduğu gibi kombine kullanım için ise ileri çalışmalara gerek olduğu vurgulanmıştır (79). İnvitro yüksek doz uygulanan



ribavirinin (200 mg) ise insan sinir hücrelerinde BNV replikasyonunu ve sitopatojeniteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (80).

BNV enfeksiyonunun endemik olduğu İsrail’de farelerde yapılan çalışmalarda donörlerden elde edilen BNV’ye spesifik antikoları içeren yüksek doz intravenöz immünoglobulin uygulamasının, BNV enfeksiyonlarında proflaktik ve terapötik etkinliği olduğuna dair oldukça başarılı sonuçlar bildirilmiştir. İnsanlarda salgınlar sırasında hiperimmüngamaglobulin uygulaması da bu sonuçları doğrulamıştır (81, 82).

### **2.11. Korunma ve Kontrol**

Hastalığın kontrol altında tutulabilmesi ve önlenmesi açısından dört önemli faktöre dikkat edilmelidir. Bunlar çevredeki mevcut olguların, atlardaki enfeksiyonun ve kuşlardaki ölümlerin izlenmesi, sivrisinek larva haritasının bilinmesi ve güncellenmesi, yetişkin sivrisinek kontrolünün sağlanması, ve bireysel risklerin azaltılmasıdır (15).

Kuşlarda yapılacak sürveyans çalışmaları, diğer hayvanlar ve insanların korunmasında uygun önlemler alınması açısından bizlere faydalı bilgiler sağlayabilir. Sürveyans çalışmaları diğer kuşlara göre kargalar hastalığa çok duyarlı olduğu için sıklıkla ölü kargaların test edilebilmesi için insanlar tarafından karga ölümlerinin bildirilmesini sağlamaya yönelik olmalıdır (83).

Henüz spesifik bir tedavisinin ve aşısının mevcut olmaması nedeniyle sivrisineklerle temastan korunmak ve sivrisinek popülasyonunun kontrolü BNV enfeksiyonunun yayılımını önlemede anahtar noktadır. Yerel yönetimler kuşlar, insanlar yada hayvanlarda BNV aktivite alanlarını belirlemeli sivrisinek kontrol programları oluşturmalı ve bu alanlardaki su birikintilerinde larvasid uygulamaları, erişkin formda ise sprey uygulamaları yapılmalıdır (7, 83).

Atlar, sivrisineklerden korunmalıdır. Aynı şekilde insanlar da sivrisinek sokmasına maruz kalmaktan korunmalıdır, özellikle sivrisineklerin en çok aktif olduğu gün batımı ve şafak vaktinde alacakaranlıkta, böcek kovucular ve perdeler bu amaçla kullanılabilir. Sivrisineklerin üreme alanları da sınırlandırılmalıdır (83).

Yumurta ve larva dönemleri, pupa formu ve yetişkin dönemi olmak üzere *Culex* türü sivrisineklerin toplam dört dönemleri vardır. Yetişkin sivrisinekler kış uykusuna yatar ve yaklaşık olarak Mayıs ayında ortaya çıkmaktadır. Bir yıl boyunca bu sivrisinekler birkaç nesil üreyebilirler. Ağustos ayında en yüksek seviyeye ulaşan sivrisinek populasyonu Eylül ayına kadar kan emmeye devam etmektedirler. Dişiler yumurtalarını oluşturmak ve beslenebilmek için kana ihtiyaç duymaktadırlar. Kan emebilmek için yaklaşık 1 millik bir alanı uçabilmektedirler. Sivrisineklerin yumurta, larva ve pupa dönemleri durgun sularda oluşur, bu nedenle de bu dönemi engellemek için durgun sular, su birikintileri kurutulmalı, ortadan kaldırılmalıdır. Larva formunda beslenme alanları ortadan kaldırılamazsa larvaların bulunduğu alanlara larvasit kullanılmalıdır. Ergin hale gelmeden sivrisineği kaynağında kontrol altına almak çok daha kolay olduğundan sivrisinek üreme alanlarında yapılan larvasit mücadelesi çok daha önem arz etmektedir. Kontrol bu yolla çok daha kolay, ekonomik ve çevre sağlığı açısından daha yararlı olacaktır. Üreme alanlarında yapılan mücadelede dünyada daha çok biyolojik ürünler tercih edilmektedir. Aynı zamanda larva mücadelesinin yürütüldüğü alanlar içi su dolmuş olan bir varil veya bir gölet gibi, ergin sivrisineklerin bulunduğu alanlara göre daha küçük alanlardır. Larvasit uygulamalarının yapıldığı su birikintilerinde yaşayan diğer canlılar ve insanların hedef dışı tutulabilmesi için zararsız biyolojik yöntemlerle larvasit ilaçlaması yapmanın önemi büyüktür. Dünyada yaygın bir şekilde biyolojik kontrol ajanları olarak bakteri kökenli *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ve *Bacillus sphaericus* preparatları kullanılmaktadır. Erişkin formdaki sivrisineklere ise sprey uygulamaları yapılmalıdır. Yetişkin dönemdeki sivrisineklerin insanlar, atlar ve diğer hayvanları ısırmasının engellenmesi gereklidir. İnsanlarla enfekte sivrisinekler arası kontak minimize edilmelidir (7, 15, 64, 78, 83).

Sivrisineklerden korunmak için yapılması önerilenler şunlardır;

\*Potansiyel olarak sivrisineklerle temas sağlanabilecek açık hava işlerinde, çevredeki besi ortamları yok edilmelidir, açık alanda uzun kollu kıyafetler, pantolonlar gibi kapalı giysiler giyilmelidir.

\*İçine sivrisineklerin yumurtlayabileceği, içinde su birikebilecek tüm eşyaların ve kullanılmayan malzemelerin (teneke kutu, şişe, plastik kaplar, otomobil lastikleri, seyyar havuz vb) otomobil lastiklerinin düzgün şekilde imhası sağlanmalıdır.

\*Çatı veya teraslarda biriken suların drenajını sağlayan boruların ve yağmur oluklarının temizliği yapılarak, tıkanıklığı kontrol edilerek, suların buralarda birikmesi engellenmelidir.

\*Süs havuzlarında sivrisinek yiyen balıklar bulundurulmalıdır.

\*Sarnıç, lağım çukuru, fosseptik çukuru, çöp kutuları ve variller bir kapakla sıkıca kapatılmalıdır.

\* Kapı, pencere ve teras gibi yerlere sineklik yapılmalıdır.

\*Bu uygulama ahırlarda da yapılmalı, pencerelere ve kapılara sineklik takılmalıdır.

\*Hem kene hem de sivrisineği aynı anda kovan repellent kullanılmalıdır. Bu amaçla insan sağlığı için zararsız olduğu bildirilen DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) içeren repellentler önerilmektedir.

\*DEET sivrisineklere ve diğer ısırıcı sineklere karşı kullanılan geniş spektrumlu bir koruyucudur. İki aydan sonraki hamileliklerde güvenle kullanılabilir.

\*Giysilere permetrin sürülmelidir.

\*Şafak vakti ve gün batımı gibi sivrisineklerin aktif olduğu saatlerde dışarı çıkılmamalıdır.

\* Sivrisinek popülasyonunun yoğun olduğu gece ve kuşluk vakti gibi zamanlarda atlar gezdirilmemeli veya çalışma yaptırılmamalıdır

\*Halk, sivrisineklerin üreme yerleri ve korunma yolları hakkında bilgilendirilmelidir.

Dikkat edilmesi gereken başka bir nokta da; bir bölgede kuş ya da at ölümlerinde dikkat çekecek şekilde artış gözlemlendiğinde hemen en yakındaki veteriner hekimler ve ilgili sağlık kuruluşlarına bilgi verilmelidir. Sivrisinek kovuculardaki DEET konsantrasyonu yetişkinler için %35'den fazla, çocuklar için ise %10'dan

fazla olmamalıdır ve giysi altına kullanılmamalıdır. Sivrisinek kovucular dışarıya çıkarken temas edebilecek her yere uygulanmalı ve günlük olarak ciltten yıkanmalı, gerek duyulduğunda tekrar kullanılmalıdır. Alkol alımının sivrisinek kovucuların ciltten emilimini arttırdığı da unutulmamalıdır (7, 46, 83).

### **2.11.1. Aşı**

İnsanlarda kullanılmak üzere FDA onaylı aşı bulunmamasına rağmen atlar için etkili ve lisanslı aşılar bulunmaktadır. Rekombine edilmiş Recombitec (canarypox) ve inaktif BNV aşısı Innovator olmak üzere iki aşı kullanımdadır. İnsanların kullanımı için inaktif aşı çalışmaları devam etmektedir (24, 84).

Bir kimerik canlı virüs aşısı olan ChimeriVax-WN02, 17-D Sarı humma virüsü aşı suşunun karşılık gelen genlerinin (YF-prM/E) yerine, BNV yapısal protein genleri (WN-prM/E) yerleştirilerek, diğer kimerik virüs aşısı ise WN-prM/E genlerinin, Dengue serotip 4 virüsüne entegrasyonu ile elde edilen aşı, olmak üzere iki farklı atenüe aşı çalışması devam etmektedir (24, 85, 86).

BNV, E ve PrM antijenlerinin ekspresyonunu sağlayan ADNA aşısı da farelerde, atlarda ve kuşlarda kullanılmıştır. Böylece BNV'nin bir alt tipi olan Kunjin virüslü kargaların aşılması BNV'ye karşı da koruyucu olmuştur (24).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmaya, Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kan merkezine Ocak 2012 - Nisan 2012 tarihleri arasında kan bağışında bulunmak üzere başvuran gönüllüler dahil edilmiş ve donörler rastgele seçilmiştir. Kan donörlerinden steril şartlarda ve hemolizsiz olarak 8-10 ml venöz kan alınmıştır. Donörlerden bir biyokimya tüpü ve bir hemogram tüpü olmak üzere iki tüp kan alınmıştır. Tam kan örnekleri PCR çalışması yapılması için çalışma yapılıncaya kadar -70 °C'de muhafaza edildi. Biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri ise 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örneklerinde BNV'ye karşı antikor varlığını tespit etmek için ELISA çalışması yapılıncaya kadar -70 °C'de saklandı. Çalışmaya dahil edilen donörlerin %99'u erkek %1'i kadın idi. Çalışmamızın etik kurul onayı Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulundan alınmıştır.

#### **3.1. ELISA Testi ile IgG ve IgM tipi antikorların Tespiti**

Serum örneklerinde BNV varlığının araştırılması için BNV antikorlarını bulmaya yönelik ticari ELISA kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. ELISA çalışması üretici firmanın belirttiği test prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

##### **3.1.1. Serum örneklerinin çözülmesi**

-70 °C'de biriktirilen serum örnekleri benmaride 37 °C'de çözüldü. Çözülen serum örnekleri çalışma yapılıncaya kadar oda ısısında (1-2 saat) tutuldu.

### 3.1.2. ELISA Yöntemi

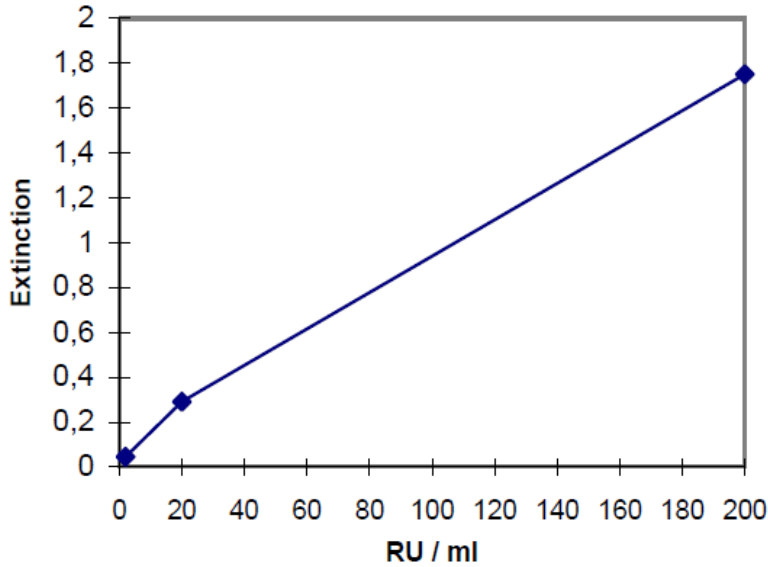
1. ELISA plağında test prosedürüne uygun olarak, pozitif ve negatif kuyucuklar için ikişer kuyucuk ayrıldı. İlk 2 kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, ikinci 2 kuyucuğa 100 µl negatif kontroller konuldu.
2. Serum örnekleri kit içerisinde bulunan tampon solüsyonu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Bu işlem için her serumdan 10 µl alındı, 100 µl tampon solüsyonu içerisine karıştırılarak 3-5 saniye vortekslendi.
3. Mikroplağın kuyucuklarına hazırlanan bu serum tampon karışımından 100'er µl konuldu.
4. Test plağının üzeri bir slayt ile kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Inkübasyon sonunda kit içerisinde bulunan washing buffer ile tüm kuyucukların yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
7. Yıkama işlemi bitiminde her kuyucuğa 100'er µl peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-human IgG solüsyonu (konjugat) eklenerek 4. maddede olduğu gibi mikroplağın üzeri slaytla kapatılarak 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
8. Inkübasyon sonunda mikroplak ELISA yıkayıcı cihaza yerleştirilerek 6. maddede olduğu gibi 3 kez yıkandı.
9. Tüm kuyucuklara 100'er µl substrat eklendi.
10. Mikroplak üzeri slaytla kapatılarak 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
11. Inkübasyon sonunda 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
12. Mikroplak ELISA reader (okuyucu) da 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulmuş ve değerlendirildi.

### 3.1.3. IgG için Cut-off hesaplanması

Sonuçların değerlendirilmesi için standartlara (Kalibratör 1, 2 ve 3) ait absorbans değerleri (optik dansite, OD) kullanılarak bilgisayar destekli bir grafik elde edildi. Oluşan grafiğe göre örneklerin antikor konsantrasyonları, mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olacak şekilde kantitatif olarak belirlendi. Buna göre; antikor değeri  $\geq 22$  RU/ml olarak bulunan örnekler pozitif,  $\geq 16$ -<22 RU/ml arasında bulunanlar şüpheli pozitif (sınırdaki), <16 RU/ml bulunanlar ise negatif olarak kabul edildi. Üretici firma testin duyarlılığını %99.5, özgüllüğünü ise %96.9 olarak belirtmiştir.

### 3.1.4. IgM için Cut-off hesaplanması

Sonuçların değerlendirilmesi için standartlara (Kalibratör 1, 2 ve 3) ait absorbans değerleri (optik dansite, OD) kullanılarak bilgisayar destekli bir grafik elde edildi (Grafik 2). Oluşan grafiğe göre örneklerin antikor konsantrasyonları, mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olacak şekilde kantitatif olarak belirlendi. Antikor değeri  $\geq 1.1$  olarak bulunan örnekler pozitif,  $\geq 0.8$  - <1.1 arasında bulunanlar şüpheli pozitif (sınırdaki), <0.8 bulunanlar ise negatif olarak kabul edildi.



Şekil 8. Batı Nil Virüs IgG ELISA Testinde Kullanılan Kalibrasyon Grafiği

### 3.2. Nükleik Asit Ekstraksiyonu

High püre viral nükleik asit ekstraksiyon kiti kullanıldı (Roche, ABD).

1. -70 °C’de saklanan örnekler 37 °C’de benmaride çözüldü.
2. Üzerine 200 µl Poly A konularak 72 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. Örneklerin üzerine 100 µl binding buffer (bağlama tamponu) eklenerek vortekslendi.
4. Örnek sayısı kadar filtreli tüp seçilerek numaralandırıldı.
5. Tüplerdeki karışım filtreli tüplere boşaltılarak 8000 g’de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Alttaki tüp atıldı ve her tüp için yerine temiz tüp yerleştirildi.
7. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitör removal buffer (inhibitör uzaklaştırıcı tampon) konularak 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edildi
8. Örneklerin altındaki tüpler atılarak yerine yeniden temiz tüpler yerleştirildi.
9. Filtreli tüpün üzerine 450 µl washing buffer (yıkama tamponu) konuldu. Örnekler 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Örneklerin altındaki tüpler atılarak yerine temiz tüpler yerleştirildi.
11. Filtreli tüpün üzerine yeniden 450 µl washing buffer (yıkama tamponu) konularak 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Örneklerin altındaki tüpler atılmadan boşaltıldı ve 13000 g’ de 10 saniye santrifüj edildi.
13. Bu aşamada ekstraksiyon yapılacak örnek sayısı kadar 1.5 ml’lik steril ependorf tüpü alınarak numaralandırıldı. Filtreli tüpler bu ependorf tüplerinin içerisine konularak üzerine 50 µl elution buffer eklendi. Sonra tüm tüpler 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Filtreli tüpler atılarak ependorf tüplerinin kapakları kapatıldı.

### 3.3. Real Time PCR Yöntemi ile Batı Nil Virüsü Tespiti

Viral nükleik asit ekstraksiyonunu takiben real-time PCR yöntemi ile BNV varlığı virüse ait cDNA’yı tespit etmeye dayalı ticari olarak temin edilen kit ile yapıldı (Roche, Almanya, Way2gene, Batı Nil Virüsü Tespit Kiti).

Çalışmada BNV cDNA’sına ait 111 bp uzunluğundaki fragment spesifik primerler ile amplifiye edilip kanal 640’da işaretli problarla tespit edildi. Standart



Çizgiler ile bilinmeyen örneğin kesin kantitasyonu sağlandı (Roche, Almanya, LightCycler Real Time PCR Sistemleri).

### **3.3.1. Test Prosedürü**

**rnek materyal:** Donör serum rnekleri.

**Negatif kontrol:** Distile su

**Pozitif kontrol:** Kit içerisinde bulunan BNV pozitif olduğu bilinen rnek.

### **3.3.2. Parametre-Spesifik Ajanların ve IPC'nin Hazırlanması**

BNV tespiti için gereken tüm primer ve problemleri içermektedir. IPC (Internal positive control) için gereken tüm primer ve problemleri içermektedir. Reaksiyon tüplerine 66 µl PCR-grade solüsyonundan ilave edildi, solüsyon vortekste karıştırıldı ve santrifüj edildi.

### **3.3.3. Pozitif Kontrollerin (Standartların) Hazırlanması**

Kit içinde bulunan hedef DNA  $10^1$  ile  $10^6$  hedef molekül/reaksiyon olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda idi. En düşük konsantrasyona sahip olan standart ile çalışılmaya başlanıldı (1. tp). Pipet ucu yardımıyla folyo ile kapatılmış kısımdan delik açıldı. Sonra tüpe 40 µl PCR-grade su ilave edildi. Hedef DNA, 10 kez pipetaj yapılarak solüsyon ile karıştırıldı. zerine 20 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA'sı ilave edildi.

### **3.3.4. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması**

Reaksiyon master miks hazırlanırken; Way2gene, BNV Tespit Kiti içerisinde bulunan ajan ve IPC miksi ile Roche Fast Start Master Kit içerisinde bulunan enzim miksi, Mg<sup>2+</sup> ve PCR-grade su kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Reaksiyon karışımının bileşenleri ve hacimleri

<b>Bileşenler</b>	<b>1 örnek için reaksiyon hacmi</b>
PCR-grade su	3.2 µl
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	1.8 µl
IPC miks	4.0 µl
Ajan miks	4.0 µl
Enzim miks	2.0 µl
Toplam	15 µl

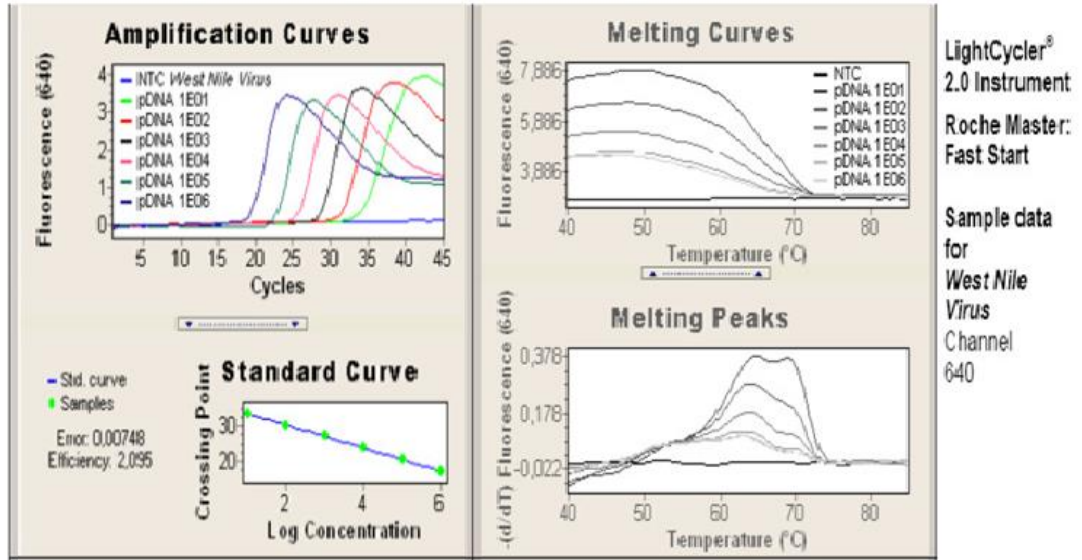
Soğutulan reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için ajanların her birinden ekleyip hacmini reaksiyon sayısı kadar çoğaltarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım santrifüjde spin edilerek kapiller tüplere her bir reaksiyon için 15 µl reaksiyon karışımından konuldu. Her bir kapillere 5 µl örnekten ilave edilmesi ile elde edilen 20 µl'lik son reaksiyon hacmi standardize edildi. Aşağıda ki ısı protokolü ile sisteme yüklendi (Tablo 2).

**Tablo 2.** Isı protokolü

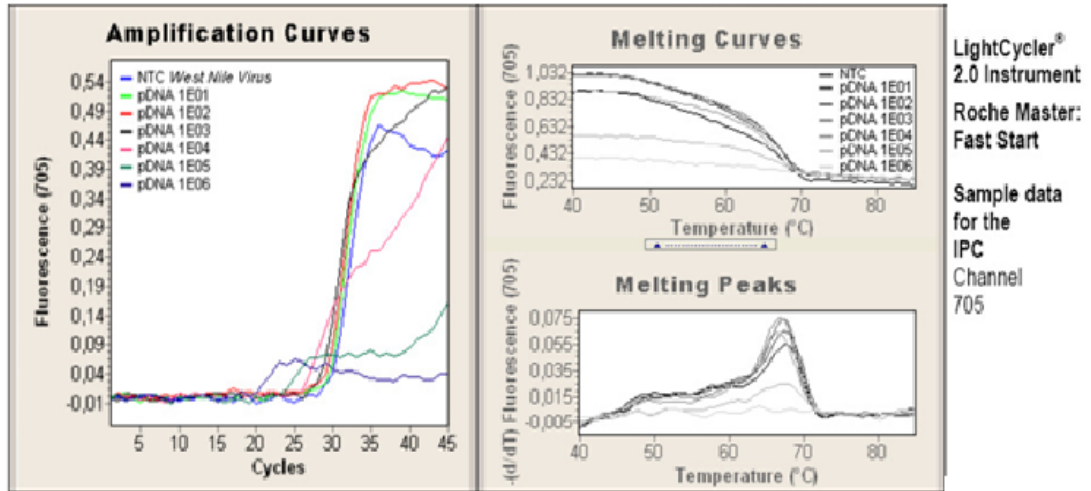
Program	Denatürasyon	Siklus			Erime (Melting)			Soğuma (cooling)
Analiz modu	None	Kantifikasyon modu			Erime eğri modu (Melting curve mode)			None
Siklus	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef (°C)	95	95	57	72	95	40	85	40
Süre (sa:dk:sn)	00:10:00	00:00:05	00:00:15	00:00:25	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate (°C/s)	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Acquisition mode	None	None	Tek	None	None	None	Devam	None

### 3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Konsantrasyonu  $10^6$  kopya/rxn ile  $10^1$  kopya/rxn arasında değişen klonlanmış saf DNA standartları 18 ila 35 döngü arasında CP's'e sahip olduğu görüldü.



Şekil 9. PCR ürünü kanal 640'da Melting Curve modunda tanımlanması.



Şekil 10. IPC ürünü Kanal 705'te Melting Curve modunda tanımlanması.

Çalışmamızda istatistiksel analizler SPSS versiyon 15 yazılımı kullanılarak yapıldı. Yaş grupları, cinsiyet ve adres bilgilerine göre BNV IgM ve IgG pozitiflikleri çapraz tablolar kullanılarak verildi. Gruplar arasında bu pozitiflikler bakımından fark bulunup bulunmadığı yerine göre Ki-kare ya da Fisher testleri kullanılarak karşılaştırıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

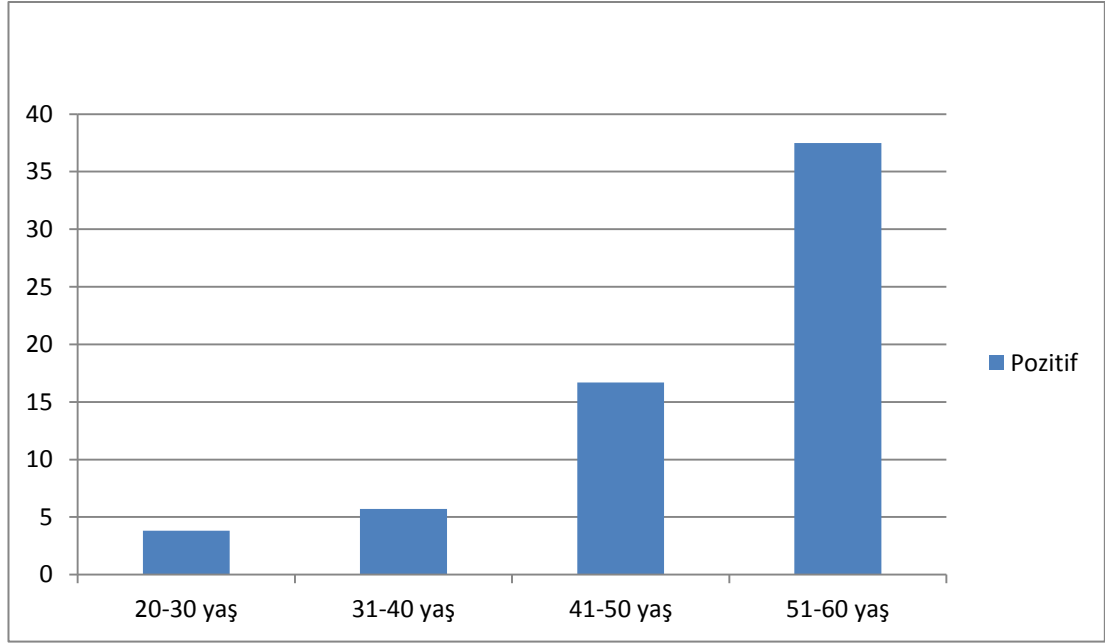
Çalışmaya alınan 200 sağlıklı kan vericisinin 198'i erkek, 2'si kadın olup, yaşları 20-58 yıl arasında (yaş ortalaması:  $34.7 \pm 9.09$  yıl) değişmekteydi. Toplam 200 serum örneğinin 19 (%9.5)'unda BNV IgG antikor pozitifliği, bir (%0,5) örnekte ise BNV IgM antikor pozitifliği saptanmıştır. Dolayısıyla toplam 20 (%10) örneğin BNV serolojisi için reaktif olduğu kabul edilmiştir. Örneklerin %90.5'i (181/200) BNV IgG antikorları açısından negatif, %99.5 (199/200)'i ise BNV IgM antikorları açısından negatif bulunmuştur.

Donörlerin yaş gruplarına bakıldığında; 20-30 yaş aralığında 78 (%39), 31-40 yaş aralığında 70 (%35), 41-50 yaş aralığında 36 (%18), 51-60 yaş aralığında 16 (%8), donör bulunmaktaydı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Donörlerin yaş aralığına göre dağılımı.

Yaş grupları	Sıklık	%
20-30 yaş	78	39
31-40 yaş	70	35
41-50 yaş	36	18
51-60 yaş	16	8
<b>Toplam</b>	200	100

BNV IgG antikor pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı incelendiğinde yaş artışı ile birlikte donör sayısının azalmasına rağmen BNV IgG antikor pozitifliğinin arttığı gözlemlendi. Donörlerde 20-30 yaş aralığında BNV IgG antikor pozitifliği %3.8 iken 51-60 yaş aralığında %37.5 olarak saptandı. Ki-kare testinde yaş artışı ile BNV IgG antikor pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptandı (ki-kare = 20.8,  $p < 0.001$ ) (Şekil 11).



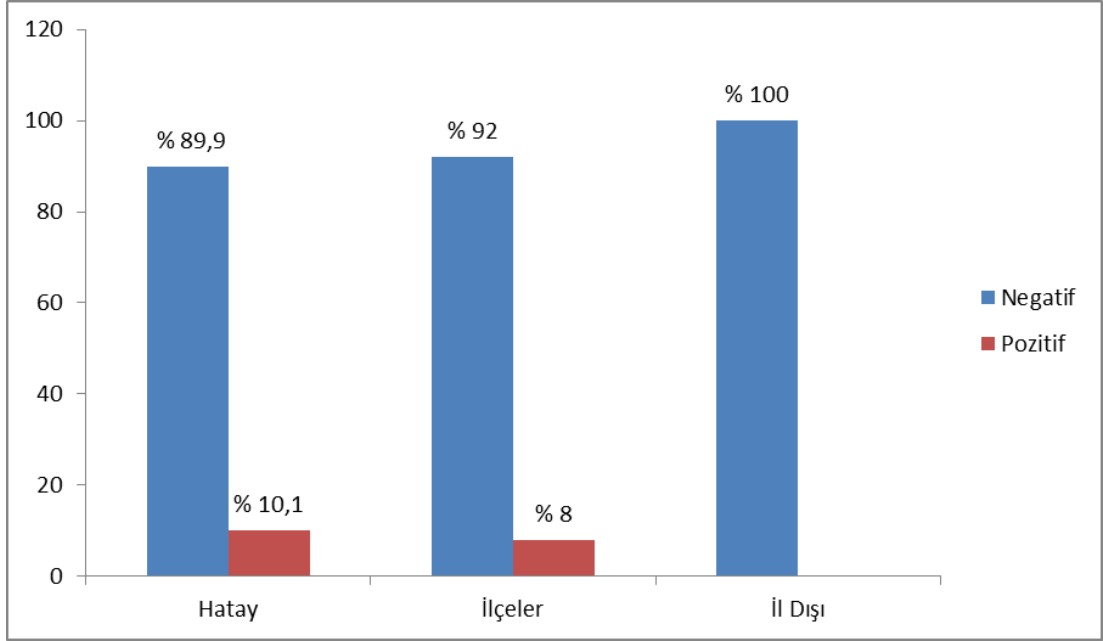
**Şekil 11.** BNV IgG pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı

Donörlerin 168'i (%84) Hatay il merkezinde, 25'i (%12,5) ilçelerinde, 7'si (%3,5) ise il dışında ikamet etmekteydi. İl dışından gelen donörler, Kars, Afşin, Malatya, İstanbul, Sivas ve Çanakkale'de yaşamaktaydılar (Tablo 4).

**Tablo 4.** Donörlerin yerleşim yerlerine göre dağılımı

Adres	Sıklık	%
Hatay	168	84
İlçeler	25	12.5
İl dışı	7	3.5
Toplam	200	100

BNV IgG antikor pozitifliği saptanan donörlerin tamamı Hatay il merkezi ve ilçelerinden gelen kan donörleri idi. Yerleşim yeri ile BNV IgG antikor pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlam yoktu ( $p>0.05$ )( Grafik 4 ).



**Şekil 12.** IgG pozitifliğinin yerleşim yerlerine göre dağılımı

Çalışmada sadece bir donörde BNV IgM antikor pozitifliği tespit edilmiştir. Donör, 29 yaşında erkek, Hatay il merkezinde ikamet etmekteydi. BNV IgM antikor pozitifliği istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

ELISA sonuçlarını moleküler bir yöntem ile karşılaştırmak amacıyla toplam 20 örnekte uygulanan gerçek zamanlı PCR yönteminde, çalışılan örneklerin tamamı viral RNA açısından negatif olarak tespit edildi.

## 5. TARTIŞMA

Üçüncü milenyum başlangıcı ile birlikte, sivrisinek, tatarcık, kene gibi kan emen artropodlarla nakledilen viral hastalıklar yani arboviral hastalıklar yeniden önem kazanmıştır. Bunlar arasında “Avustralya Barmah ormanları virüs” enfeksiyonu gibi yeni tanımlanan bazı hastalıklarla birlikte Dengue hemorajik ateşi, Sarı humma, Japon ensefaliti, BNV enfeksiyonu ve Malarya gibi hastalıklar eskiden kontrol altında tutulabilirlerken günümüzde prevalanslarında artış saptanmıştır (40).

Afrika, Asya, Avrupa ve Avustralya kıtalarında endemik olup, muhtemel orijini Ortadoğu olarak bilinmekle birlikte, 1999 yılında New York'ta ortaya çıkan hastaneye yatırılan 59 vaka ve 7 ölümlü sonuçlanan Batı Nil meningoensefaliti epidemisi virüslerin, yani arbovirüslerin kıtalar ve yarımküreler aşabilme yeteneği konusunda kötü bir gösterge olmuştur. Aynı zamanda yine New York salgını bizlere, şehirlerde sürekli olarak sivrisinek vektör kontrolü olmaması halinde, dünyanın en gelişmiş ve zengin şehirlerinin bile arbovirüs epidemisi riski altında olduğunu göstermiştir (1). BNV 1999'da Batı Yarımkürede saptandıktan sonra Kuzey Amerika'da 16.000'den fazla insanda hastalığa ve 660'dan fazla ölüme neden olmuştur (24). Daha sonra 1999- 2001 yılları boyunca ABD'nin doğu yarısına ve Kanada'nın güney bölgesine yayılan BNV, bir gerçeği göz önüne sermiştir; arbovirüs bulaş siklüsü ve koruma mekanizmaları genellikle çok kompleks olsa da, arbovirüsler ancak yeterli vektör, uygun vertebralı konakçı ve güvenilir kış şartları mevcutsa yeni yerlerde ortaya çıkabilmektedirler. BNV'nin Kuzey Amerika'daki birkaç kuş türünde yaygın mortaliteye sebep olması, virüsün yeni bir ekosisteme ulaştığını ve beklenmeyen sonuçlara sebep olabileceğini de bizlere göstermiştir (1).



BNV için yüksek riskli coğrafik alanların saptanmasında iklimsel faktörler, vektör popülasyonları ve rezervuar dinamikleri önemli faktörlerdir. BNV enfeksiyonu vakalarının lokalizasyon analizinde; 1999 New York salgını, bitki örtüsünün fazla olduğu alanlarda daha fazla oranlarda saptanmış iken 2002 Chicago salgınının bitki örtüsünün fazla olduğu alanlar yanında insan popülasyon yoğunluğu az olan, ölü kuşlara yakın alanlar olduğu tespit edilmiştir. Kuşlar BNV'nün yayılımında en önemli konaktır. Göçmen kuşların uzun mesafeli yolculuğu ve diğer kuşların bölgesel hareketleri BNV yayılımına katkıda bulunmaktadır. *Culex* türleri olmak başta üzere çok sayıda sivrisinek türü tarafından taşınan özellikle kuşlar ve diğer vertebralılar arasında yaşam döngüsünü sürdüren BNV gelecekte de önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam edecektir. BNV enfeksiyonları ile baş etmede enfekte sivrisinek maruziyetinden korunmak ve vektör kontrolü bizim için temel yaklaşımdır (5).

BNV'nin Afrika'da, *Culex univittatus* sivrisinek türü ile kuşlar arasında enzootik bir döngüsü vardır. Bu kuşların göç yolları ise Ortadoğu, Türkiye, Karadeniz ve Tuna Deltası'ndaki ana sığınaklar üzerindedir. Sıcak hava termalleri sadece karalar üzerinde oluştuğu için denizi geçmek zorunda kalan göçmen kuşlar en dar yerlerden geçişleri tercih ederler. Afrika ile Avrupa arasında göç eden, göçmen kuşlar bu nedenle özellikle Cebelitarık ve İstanbul Boğazı'nda yoğunlaşırlar benzer şekilde; Kuzey ve Güney Amerika arasında göç eden, göçmen kuşlar da Panama Kanalı'nda yoğunlaşırlar. Yapılan çalışmalar, virüsün coğrafik yayılımında göçmen kuşların anahtar rolü olduğunu göstermektedir. Hastalığın yayılmasında göçmen kuşlarla temas içerisinde olan yaban hayatındaki göç etmeyen kuşlar da rol almaktadır. Yaklaşık 100 civarında kuş alanı bulunan ülkemiz kuş alanları bakımından da zengindir (40, 78).

Sivrisineklerde Anadolu faunası olarak *Cx univittatus* varlığına ek olarak *Cx. Pipiens*'in yaygın olduğu bilinmektedir. Ülkemiz göçmen kuşların göç güzergâhında olması, ılıman iklim koşulları, virüs için vektör kapasitesine sahip çeşitli sivrisinek türlerinin varlığı ve BNV enfeksiyonu salgın bildirimleri olan sınır komşulukları dolayısı ile BNV aktivitesi açısından endemik kabul edilebilecek bir coğrafyada bulunmaktadır. Kan donörleri ile çeşitli memeli türlerinde BNV aktivitesinin

saptanmasına yönelik olarak yapılan seroepidemiolojik çalışmalar da virüs maruziyetini kanıtlamaktadır (9).

Ülkemizde 1964 yılında Heperkan ve Arı, 1966 yılında Serter F. tarafından gerçekleştirilen iki çalışma sonucunda Arbovirüslerin varlığı doğrulanmıştır. 1971 de Radda tarafından Hatay çevresinde BNV'nin aktif olduğu bildirilmiştir (9, 45, 46).

Özkul ve arkadaşları da 2005 yılında yaptıkları çalışmada Hatay bölgesinde eşek ve katırlarda seropozitifliği %2.5 olarak saptamışlardır. Bu bölgemizde BNV varlığını gösteren ikinci çalışmadır (50).

Sağlıklı 181 kişinin serum örnekleri ile 2007 yılında yapılan başka bir çalışmada indirekt immun floresan yöntemi ile BNV'ye karşı oluşan IgG sınıfı antikorlar araştırılmış seropozitiflik %16 olarak bulunmuş, seropozitifliklerin %9.5'i plak redüksiyon nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (51). Ergünay ve arkadaşları Orta Anadolu bölgesinde 2516 kan donörünü ELISA yöntemi ile taramış ve pozitif bulunan 25 (%0.99) örnek PRNT yöntemi kullanılarak doğrulandığında oranı %0.56 olarak saptamışlardır (52). 2010 yılında Hızel ve arkadaşlarının Ankara bölgesinde 2821 sağlıklı kan donörlerinde BNV EIA IgG varlığını araştırdıkları çalışmalarında 28'inde (%0,9) kesin, 41'inde (%1,4) sınırda pozitiflik olmak üzere %2.4 oranında pozitiflik saptamışlardır. Bu örnekler ve 60 negatif örnek olmak üzere toplam 129 kişinin kan örneğinde ayrıca real-time PCR çalışılmış ve hepsinde BNV RNA negatif bulunmuştur. Orta Anadolu bölgesinde, Güneydoğu Anadolu bölgesine göre sivrisineklerle bulaşan enfeksiyonların daha az görüldüğü bilinmektedir. Yapılan, her iki çalışmada da bu bölgesel farklılığa uygun olarak BNV seropozitifliği diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur (87).

Ayturan ve arkadaşlarının Nisan-Aralık 2009 tarihlerinde Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran 1200 kan donörüne ait Serum örneklerinde yaptığı çalışmada BNV IgG antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmış; taramada pozitif bulunan örneklerle, virüs ile karşılaşma zamanının belirlenebilmesi için BNV IgG avidite testi uygulanmıştır. Yapılan bir çalışmada düşük aviditenin 6 aydan kısa bir sürede enfeksiyon geçirildiğini, yüksek aviditenin ise 6 aydan daha önce enfeksiyon geçirildiğinin göstergesi olduğu saptanmıştır. Bu

çalışmada ise 19 (%1.6) donöre ait serum örneğinde ELISA ile BNV IgG antikor pozitifliği saptanmış ve örneklerin tümünde yüksek aviditeli IgG antikorları tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile saptanan pozitiflik, PRNT ile %0.8 (10/1200) olarak doğrulanmıştır (88, 89).

Ankara bölgesi kan donörlerine dair bir başka çalışma ise 2011 yılında Şahiner ve arkadaşları tarafından 729 gönüllü kan donörü dahil edilerek gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı RT-PCR analizleri sonucunda, çalışmaya dahil edilen serum örneklerinin hiçbirisinde BNV viral RNA varlığı saptanmamıştır (4).

Ülkemizde farklı bölgelerde BNV aktivitesinin varlığı çeşitli seroepidemiolojik çalışmalarla doğrulanmış olmakla birlikte semptomatik BNV enfeksiyonlarına dair veriler çok daha kısıtlı sayıdadır. İlk vaka Arpacı ve arkadaşlarının rapor ettiği kemik iliği transplantasyonu sonrasında gelişen nedeni açıklanamayan yüksek ateş ve nörolojik bulguların ortaya çıkması sonucu değerlendirilerek kanda BNV RT-PCR pozitif saptanan bir olgudur (90).

Ergünay ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan retrospektif çalışmasında ise 87 nedeni bilinmeyen merkezi sinir sistemi enfeksiyonu vakası değerlendirilmiş; serum ve BOS örnekleri toplanmış, ELISA ve IFA yöntemleri ile BNV IgM ve IgG antikorları araştırılmıştır. Çalışmada 2 olgu (%2.3) muhtemel BNV enfeksiyonu olarak değerlendirilmiştir. BNV IgM'i pozitif olarak izlenen serum örneklerinin, antikor özgüllüğünün doğrulanması amacıyla virüs nötralizasyon testi ile değerlendirilmesinin amaçlandığı bu çalışmada örnek miktarının kısıtlılığına bağlı olarak, hastalardan sadece birinde test pozitif olarak saptanmıştır. Bu hasta kliniğe yüksek ateş, baş ağrısı ve bilinç bulanıklığı şikâyetleriyle başvurmuş olup nedeni bilinmeyen viral ensefalit ön tanısı ile takip edilmiştir (65, 91).

Ankara bölgesinde 2011 yılında rapor edilen diğer bir olguda, BOS'da pleositoz ve artmış protein, serumda ise BNV'ye özgül IgM saptanmış fakat takibinin 9. gününde hasta kaybedilmiştir (92).

BNV kaynaklı MSS enfeksiyonuna dair en son veri Öcal ve arkadaşlarının bildirdiği, Mayıs 2012 tarihinde bilinç bulanıklığı, el-kol ve yüzde kas kasılmaları şikâyetleri ile başvuran bir hastada BNV PCR, BOS ve serum örneğinin her ikisinde

de pozitif bulunmuş, etken virüsün "Lineage 1 Clade 1a" olduğu saptanmıştır. Özkul ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada Eskişehir ve Ankara kaynaklı insan ve at olgularında da aynı köken virüsler ilk kez saptanmıştır. Bu veriler, Orta Anadolu bölgesinde "Lineage 1" virüslerin dolaşımında olduğunu göstermektedir (93).

ABD'de 2002 yılında BNV salgını sırasında, virüsün transfüzyon yoluyla bulaştığının gösterilmesi ile kan bankacılığı açısından önemli bir problem olduğu ortaya çıkmıştır. Asemptomatik kan bağışçılarında sadece BNV seropozitifliğinin araştırılması bulaşı önlemede yetersiz kalmıştır (57). Bu nedenle 2003 yılı Haziran ayından itibaren FDA onayı ile viremik donörlerin taranmasında NAT kullanılmaya başlanmıştır. 2003-2004 yılları arasında rutin tarama ile 540 viremik kan bağışçısı tespit edilmiştir (94). Aynı yılda Kanada kan donörleri de NAT ile taranmış ve 14 kişide BNV RNA pozitifliği saptanmıştır. Hiçbir alıcıda kan yoluyla BNV bulaşı saptanmadığı için de tarama başarılı olarak değerlendirilmiştir (95). 2004 yılında Hollanda'da 61992 kan donörünün tarandığı çalışmada da BNV viral RNA'sı negatif saptanmıştır (96).

İtalya kuzeyinde, 2009 yazında 5726 kan donörü NAT ile BNV virüs RNA'sı açısından taranmış sadece bir donörde pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda çok düşük oranda pozitiflik saptansa bile BNV bulaş riskini azaltmak için taramaya ihtiyaç olduğu yönünde görüş bildirilmiştir (97).

Bizim çalışmamızda, Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörlerinde BNV IgG ve IgM antikor varlığının ELISA yöntemi ile araştırılması ve pozitif sonuç alınan örneklerin real-time PCR yöntemi ile karşılaştırılması, bölgemiz ve ülkemiz BNV seroepidemiolojik verilerine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu çalışma Hatay bölgesi sağlıklı kan donörlerinde BNV seroprevalansının araştırıldığı bölgemizdeki ilk çalışmadır. Çalışmamız bölgemizdeki kan donörlerinde riskleri ortaya koymak açısından yol gösterici olabilecek ve zaman zaman kliniğimize nedeni bilinmeyen ateş, bilinç değişikliği şikâyetleri ile başvuran fakat tanı koyamadığımız vakaları değerlendirirken akılda tutmamızı sağlayacaktır.

Çalışmamızda 200 kan donöründe BNV IgG seropozitiflik oranı %9.5 (19/200), BNV IgM seropozitiflik oranı %0.5 (1/200) olarak saptanmıştır. ELISA yöntemi ile BNV IgG ve IgM pozitif olarak saptanan donör örneklerine, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan real-time PCR metodu uygulanmıştır. Çalışma sonucunda ELISA pozitif örneklerin hiçbirinde BNV viral RNA'sı saptanmamıştır. ELISA yöntemi ile BNV IgG ve IgM antikorlarının toplamda %10 oranında pozitif bulunmasına karşılık, BNV viral RNA'sının negatif bulunması; bu hastalıkta vireminin kısa süreli olmasına veya saptanan antikorların diğer flavivirüslerle çapraz reaksiyon vermelerine bağlanabilir. Fakat bu iki sonuçtan hangisinin daha olası olduğunu anlamak mümkün görünmemektedir.

Bizim çalışmamızda BNV seropozitifliği %10 olarak tespit edilmiştir. Ergünay ve arkadaşları tarafından yapılmış olan ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde BNV IgG pozitifliğini %16 olarak bulmuş oldukları çalışmadaki sonuçlar bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Meço ve arkadaşlarının hemagglütinasyon inhibisyon yöntemiyle yapmış oldukları çalışmada bulmuş oldukları %38 ile %47,8 gibi değerler bizim çalışmamızla kıyaslandığında oldukça yüksek bulunmuştur. Fakat diğer bazı çalışmalarda seropozitiflik oranı Orta Anadolu bölgesi kan donörlerinde %1, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran donörlerde %1.6, Hızel ve arkadaşlarının Ankara bölgesi kan donörlerinde yaptığı çalışmada %2.4 olarak bulunmuş ve saptanan bu değerler bizim bulduğumuz değerlerden oldukça düşük kalmıştır. Ülkemizde çeşitli bölgelerde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, BNV'ye karşı seropozitiflik oranlarının %0.6-57 arasında geniş bir yelpazede saptandığı görülmektedir (9, 47). Bu sonuçlarda ülkemizde BNV seroprevalansındaki bölgesel farklılığı doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda ELISA yöntemiyle pozitif bulunan örneklere uygulanan RT-PCR metodu ile BNV viral RNA'sı saptanmamıştır. Bu sonuçla uyumlu olarak Hızel ve arkadaşlarının yaptığı çalışma gibi Şahiner ve arkadaşlarının çalışmalarında da PCR negatif saptanmıştır. Oysa bize komşu illerden Mersin'de yaşayan kan donörlerinde RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan tarama sonrasında %2.7 oranında viremik örnek saptanmıştır (4, 9, 87).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde Almanya’da ve komşumuz İran’da kan donörlerinde yapılan çalışmalarda IgG seropozitiflik oranı sırasıyla %5.9 ve %5 olarak tespit edilmiştir. Yine her iki çalışmada bizim sonuçlarımızla uyumlu şekilde tüm donörlerde PCR negatif bulunmuştur. Özellikle komşumuz İran’da elde edilen veriler aynı coğrafyayı paylaşmamız ve benzer iklim koşullarına sahip olmamız dolayısıyla anlamlıdır (98, 99).

Çalışmamızda yaş artışı ile birlikte BNV IgG pozitifliğinin arttığı saptanmıştır. 20-30 yaş aralığında %3.8 olan oran, 51-60 yaş aralığında artarak %37.5 olarak bulunmuştur. Oysa çalışmaya 20-30 yaş aralığında 78 donör, 51-60 yaş aralığında 16 donör katılmıştır. Yani donör sayısı azalırken seropozitiflikte artış saptanmıştır. İlk olarak Heperkan ve Arı, ardından Meço ve arkadaşları bizim çalışmamıza benzer şekilde seropozitifliğin yaşla arttığını bildirmişlerdir (45, 47). Bu durum insanların yaşam sürelerinin artışı ile birlikte vektörlerle karşılaşma şansının artması ile açıklanabilir.

Bugün bir çok laboratuvarında BNV’nun serolojik tanısında, spesifik ELISA IgG ve IgM antikollarının araştırılması, yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA yönteminde antijen kaynağı ve test platformuna bağlı olarak duyarlılık ve özgüllük farklılıklar göstermektedir. Ludolfs ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada ELISA sensitivitesini %77.6, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla %93.3 ve %98.8 olarak bulmuşlardır. BNV IgM ve IgG antikollarının serumda uzun süre kalıcı olabilmesi, akut enfeksiyonun geçirilme zamanı ile ilgili sorun teşkil edebilmektedir. Ayrıca enfeksiyonun başlangıcından 5-7 gün sonrasına kadar kandan antikolların tespiti mümkün değildir. Buna bağlı olarak yalancı negatiflikler de olabilmektedir. Bu nedenle, hızlı ve doğru moleküler yöntemler, teşhis ve epidemiyolojik sürveyans için gereklidir. Moleküler yöntemler, spesifik, hassas ve hızlı olmalarından dolayı akut faz için kullanılabilirler. Fakat bu yöntemlerde seçilen hedef bölge, test formatı ve algılama yöntemi bakımından farklılıklar gösterirler (100, 101).

Petersen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada real-time PCR test sonuçları, beyin omurilik sıvısı örneklerinin %55 ve serum örneklerinin %10’unda olumlu bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise PCR sensitivitesi RT-PCR metodunda

(TaqMan) BOS'ta %57, serumda %14 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada PCR testinin serum örneklerinde BNV tanısında düşük duyarlılık göstermesinden dolayı rutin tanı yöntemi olarak kullanılmaması gerektiği de vurgulanmıştır (7, 23).

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörlerinde ELISA yöntemi ile BNV IgG seropozitiflik oranı %9.5 (19/200), BNV IgM seropozitiflik oranı %0.5 (1/200), olarak saptanmış pozitif örneklerde real-time PCR yöntemi ile viral RNA negatif olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda, kan donörlerinde saptanan bu yüksek BNV IgG pozitiflik oranı, donörlerin yaşamlarının farklı zaman dilimlerinde BNV ile karşılaşmış olduklarının bir göstergesi olabileceği gibi çapraz reaksiyon ile de açıklanabilir.

Her ne kadar bizim çalışmamızda Real-time PCR ile viral RNA negatif saptanmış olsa da serolojik yöntemlerden çok daha duyarlı ve özgüllüğü yüksek moleküler testler kan kaynaklarının güvenilirliği ve sağlıklı kan temini açısından donörlerin taranmasında kullanılmalıdır. Yıllardır ABD gibi birçok ülkede kan bankacılığında NAT gibi moleküler bir yöntemle donörlerde BNV virüs RNA'sı taranmaktadır. Fakat viremi süresinin kısalığı, kullanılan moleküler yöntemlerin duyarlılığının farklı olabilmesi, düşük titrelerde BNV içeren enfekte kanların mevcut tarama testlerinden kaçabilmesi gibi sebeplerden dolayı gelecekte güvenli kan kaynakları sağlanabilmesi için 'kan ürünlerinde patojen inaktivasyonu' gibi ek yöntemleri de gözden geçirmemiz gerekmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin bölgemizde BNV sirkülasyonunun aktif olabileceğinin bir göstergesi olarak ülkemiz BNV veri tabanına fayda sağlamasını ümit etmekteyiz.



## 7. KAYNAKLAR

1. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(9):519-29.
2. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet neurology*. 2007;6(2):171-81.
3. Granwehr BP, Lillibridge KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA, et al. West Nile virus: where are we now? *The Lancet infectious diseases*. 2004;4(9):547-56.
4. Şahiner F, Avcı İY, Bedir O, Koru Ö, Şener K, Yapar M, et al. Kan Donörlerinde Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Batı Nil Virüsü RNA'sının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2012;46(3):464-9.
5. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(8):1167-73.
6. Hayes EB, Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annual review of medicine*. 2006;57:181-94.
7. Sampathkumar P. West Nile virus: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2003;78(9):1137-43; quiz 44.
8. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2004;23(3):147-56.
9. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(6):731-41.
10. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro surveillance*. 2012;17(21).

11. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine.* 1940;20:471-92.
12. Smithburn KC. Differentiation of West Nile virus from the viruses of St. Louis and Japanese B encephalitis. *Journal of Immunology.* 1942;44:25-31.
13. Philip CB, Smadel JE. Transmission of West Nile virus by infected *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1943;53:49-50.
14. Smithburn KC, Jacobs HR. Neutralization-tests against neurotropic viruses with sera collected in Central Africa. *Journal of Immunology.* 1942;44:25-31.
15. Kılıç A, Doğanç L. Batı Nil Virus. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* 2003;33:284-290.
16. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1956; 5 579-620.
17. Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1955;4(5):872-88.
18. Klingberg MS, Jasinka-Klingberg W, Goldblum N. Certain aspects of the epidemiology and distribution of immunity to West Nile virus in Israel. *Proceedings of 6th International Congress of Tropical Medicine, Malaria.* 1959; 5 132-40.
19. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I, Meenehan GM. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) vittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science.* 1976;72:295-300.
20. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;951:117-26.
21. Schmidt JR, Elmansoury HK. Natural and Experimental Infection of Egyptian Equines with West Nile Virus. *Annals of tropical medicine and parasitology.* 1963;57:415-27.
22. Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, Lang R, Nassar F, Ben David D, et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerging infectious diseases.* 2001;7(4):686-91.
23. Petersen LR, Roehrig JT. West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerging infectious diseases.* 2001;7(4):611-4.

24. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(8):1174-9.
25. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *American family physician*. 2003;68(4):653-60.
26. Reiter P. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro surveillance*. 2010;15(10):19508.
27. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V, et al. West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008. *Euro surveillance*. 2008;13(45):pii: 19030.
28. Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro surveillance*. 2009;14(40).
29. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro surveillance*. 2010;15(34).
30. Prowse CV. An ABC for West Nile virus. *Transfusion Medicine*. 2003;13(1):1-7.
31. Sanchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*. 2005;336(1):70-82.
32. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *Journal of virology*. 2000;74(7):3253-63.
33. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *Journal of virology*. 2006;80(19):9349-60.
34. Deubel V, Fiette L, Gounon P, Drouet MT, Khun H, Huerre M, et al. Variations in biological features of West Nile viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:195-206.
35. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*. 2002;298(1):96-105.

36. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenbock H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(4):618-23.
37. Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R, Palacios G, et al. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(2):222-30.
38. Ergünay K, editor. *Batı Nil Virüsü: Viroloji, Epidemiyoloji ve Mikrobiyolojik Tanı*. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu; 2010; Ankara.
39. Solomon T, Ooi MH, Beasley DW, Mallewa M. West Nile encephalitis. *British Medical Journal*. 2003;326(7394):865-9.
40. Özer N. Batı Nil Virüsü ve Vektörleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2006;40 121-8.
41. Eidson M, Komar N, Sorhage F, Nelson R, Talbot T, Mostashari F, et al. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):615-20.
42. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):643-50.
43. McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:54-7.
44. Brault AC, Langevin SA, Bowen RA, Panella NA, Biggerstaff BJ, Miller BR, et al. Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(12):2161-8.
45. Heperkan Y, Arı A. Türkiye’de ARBOR virusları üzerinde bir çalışma. *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*. 1964;24:113-7.
46. Tosun S. Batı Nil virüs enfeksiyonu. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012;29:183-92.
47. Meço O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutinationinhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 1977;11:3-17.
48. Allwinn R, Doerr HW, Emmerich P, Schmitz H, Preiser W. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Medical microbiology and immunology*. 2002;190(4):199-202.
49. Serter D. Present status of arbovirus sero -epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1980(S9):155-61.

50. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology and infection*. 2006;134(4):826-9.
51. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7(2):157-61.
52. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Menemenlioglu D, Turan HM, Ozkul A, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(8):771-5.
53. Kalaycıoğlu H. Türkiye’de görülen West Nile vakalarının epidemiyolojisi. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 2010:174-83.
54. Danis K, Papa A, Papanikolaou E, Dougas G, Terzaki I, Baka A, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro surveillance*. 2011;16(34).
55. Hollinger FB, Kleinman S. Transfusion transmission of West Nile virus: a merging of historical and contemporary perspectives. *Transfusion*. 2003;43(8):992-7.
56. Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*. 2002;42(8):1019-26.
57. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *The New England journal of medicine*. 2003;349(13):1236-45.
58. Karadeniz A, Çağatay AA. Kan Transfüzyonu ile Bulaşan İnfeksiyöz Etkenler. *Yoğun Bakım Derneği Dergisi*. 2005;3(2):24-35.
59. Gould LH, Fikrig E. West Nile virus: a growing concern? *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1102-7.
60. Detection of West Nile virus in blood donations--United States, 2003. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2003;52(32):769-72.
61. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 2003;348(22):2196-203.
62. Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2002;51(39):877-8.

63. Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2002;51(50):1135-6.
64. Yazıcı Z. Batı Nil Virüsü enfeksiyonu. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 2005;19 (1):139-43
65. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Şener B, Lederer S, Steinhagen K, et al. Ankara Bölgesinde Nedeni Bilinmeyen Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Batı Nil Virüsünün Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 2010;44 255-62.
66. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. Annals of internal medicine. 2002;137(3):173-9.
67. Azap A, Meço O. Batı Nil virüsü ansefaliti. Klinik Gelişim Dergisi. 2010;23(3):51-5.
68. Bakanlığı S. Batı Nil Virüs Enfeksiyonları Vaka Yönetim Algoritması ve Örnek Gönderme Kriterleri. 2013; Available from: [www.thsk.gov.tr](http://www.thsk.gov.tr).
69. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. Clinics in laboratory medicine. 2010;30(1):47-65.
70. Marfin AA, Gubler DJ. West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2001;33(10):1713-9.
71. Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA. The West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2000;30(3):413-8.
72. Gyure KA. West Nile virus infections. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2009;68(10):1053-60.
73. Serter D. Arbovirüs enfeksiyonlarında tanı ilkeleri. XIII Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 2007:106-8.
74. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. The Journal of infectious diseases. 2008;198(7):984-93.
75. Prince HE, Tobler LH, Lape-Nixon M, Foster GA, Stramer SL, Busch MP. Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors. Journal of clinical microbiology. 2005;43(9):4316-20.

76. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(1):33-6.
77. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(11):4066-71.
78. Özkan D. İstanbul'da Batı Nil Virusu Taraması. Yüksek Lisans Tezi. 2006.
79. Anderson JF, Rahal JJ. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(1):107-8.
80. Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(4):1214-7.
81. Shimoni Z, Niven MJ, Pitlick S, Bulvik S. Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):759.
82. Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I, Khinich Y, Nur I, Laub O, et al. Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC infectious diseases*. 2009;9:18.
83. Ertürk A. Batı Nil virüsü enfeksiyonunda korunma ve kontrol. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 2010:166-73.
84. Tezcan S, Ülger M, Emekdaş G. Batı Nil Virusu İnfeksiyonu. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Dergisi*. 2011;4(3):9-17.
85. Monath TP, Liu J, Kanesa-Thasan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, et al. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(17):6694-9.
86. Pletnev AG, Claire MS, Elkins R, Speicher J, Murphy BR, Chanock RM. Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology*. 2003;314(1):190-5.
87. Hızel K, Yenicesu İ, Erdal B. Sağlıklı Kan vericilerinde Batı Nil Virüsü seroprevalansının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010;44 425-30.
88. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M, Steinhagen K, et al. Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(12):5873-5.

89. Ayturan Ş, Aydoğan S, Egünay K. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Donörlerinde Batı Nil Virüsü Seroprevalansının Araştırılması ve Pozitif Sonuçların Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi ile Doğrulanması. Mikrobiyoloji Bülteni. 2011;45(1):113-24
90. Arpacı F, Çetin T, Kubar A. West Nile Virus infection in a patient with acute graft-versus-host disease. Haematologica 2009;94(S2):687.
91. Ergünay K, Özkul A. Ankara bölgesinde nedeni bilinmeyen santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan Batı Nil virüsü seropozitifliğinin doğrulanması. Mikrobiyoloji Bülteni. 2011;45(2): 381-3.
92. Yeşilkaya A, Kurt Azap O, Arslan H. Ölümcül seyreden Batı Nil virüsü ensefaliti olgusu. Mikrobiyoloji Bülteni. 2012;46(3):488-92.
93. Öcal M, Önder H, Arsava EM. Ankara ilinde Batı Nil Virüsü Köken-1 Kaynaklı bir Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonu Olgusu. Mikrobiyoloji Bülteni. 2013;47((1):164-72.
94. Stramer SL, Fang CT, Foster GA, Wagner AG, Brodsky JP, Dodd RY. West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. The New England journal of medicine. 2005;353(5):451-9.
95. Cameron C, Reeves J, Antonishyn N, Tilley P, Alport T, Eurich B, et al. West Nile virus in Canadian blood donors. Transfusion. 2005;45(4):487-91.
96. Koppelman MH, Sjerps MS, de Waal M, Reesink HW, Cuypers HT. No evidence of West Nile virus infection in Dutch blood donors. Vox sanguinis. 2006;90(3):166-9.
97. Pezzotti P, Piovesan C, Barzon L, Cusinato R, Cattai M, Pacenti M, et al. Prevalence of IgM and IgG antibodies to West Nile virus among blood donors in an affected area of north-eastern Italy, summer 2009. Euro surveillance. 2011;16(10).
98. Pfliegerer C, Blumel J, Schmidt M, Roth WK, Houfar MK, Eckert J, et al. West Nile virus and blood product safety in Germany. Journal of medical virology. 2008;80(3):557-63.
99. Sharifi Z, Mahmoodian Shooshtari M, Talebian A. A study of West Nile virus infection in Iranian blood donors. Archives of Iranian medicine. 2010;13(1):1-4.
100. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. Virology journal. 2013;10:58.



101. Ludolfs D, Niedrig M, Paweska JT, Schmitz H. Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2007;26(7):467-73.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Ayla ERSOY KILINÇ, 1971 yılında Adana’da doğdu. 1988 yılında Mersin Gazi Lisesi’ni, 1995 yılında ise Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi’ni bitirdi. 2007 yılında araştırma görevlisi olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda çalışmaya başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.