

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BATI NİL VİRÜSÜ VARLIĞININ MARMARA BÖLGESİ
KAN DONÖRLERİNDE SEROLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

ESRA BAKIR

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. YAVUZ UYAR**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Esra BAKIR tarafından hazırlanan "BATI NİL VİRÜSÜ VARLIĞININ MARMARA BÖLGESİ KAN DONÖRLERİNDE SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

19 / 06 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Nuri KIRAZ İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

2.Prof. Dr. Murat HÖKELEK İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

3.Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

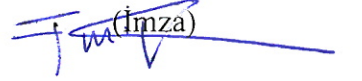
4.Doç.Dr.Yavuz UYAR(Danışman) İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

5.Doç. Dr. Mesut YILMAZ Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim

Esra BAKIR

 (imza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Eğitim ve öğrenimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocamız, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, azminden ilham aldığım, fikirleriyle tezimin gelişmesine yön veren, akademik gelişimimde büyük katkıları olan, değerli hocam Doç. Dr. Yavuz UYAR'a

Yetişmemde çok emekleri geçen kürsümüzün değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Murat HÖKELEK, Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Hrisi Bahar TOKMAN, Doç. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Yrd. Doç. Dr. Erdal POLAT ve ayrıca Doç. Dr. A. Suat SARIBAŞ, Doç. Dr. Mustafa ASLAN, Doç. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr. Pelin Yüksel ve Uzman PhD. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya

Tez çalışmam için gereken desteği esirgemeyen Prof. Dr. Zafer BAŞLAR'a, Prof. Dr. Muzaffer DEMİR'e, Doç. Dr. Mehmet KÖROĞLU'na, ve Doç. Dr. Birsen MUTLU'ya

Desteđini ve yardımlarını asla esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Harika Öykü DİNÇ, Zeynep TANER, Nergiz İMAMOVA, Eylül Yağmur DOĐANTÜRK ve Okan AYDOĞAN'a

Tecrübelerinden her zaman faydalandığımız sevgili doktora öğrencileri, Asiye KARAKULLUKÇU, Serhat SİREKBASAN ve Sümeyye ŞEN'e

Çok değerli Uzmanlık öğrencileri; Sema TURAN UZUNTAŞ, Nurhadiye KURU, Elvin PAZAR YILDIRIM, Zafer HABİP ve Taner Tahir KİRAZOĞLU'na

Hayatımın her döneminde desteklerini ve dualarını esirgemeyen; anneme, babama ve akademisyen olma yolunda varlığıyla ve desteğiyle hep yanımda olan abime

teşekkür ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 44297

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Virüsün sınıflandırması	5
2.3. Virüsün Yapısı ve Genomik Organizasyonu	7
2.3.1. Yapısal Proteinler.....	8
2.3.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP).....	9
2.4. Virüsün Replikasyon Döngüsü	9
2.5. Virüsün Yaşam Döngüsü	12
2.6. Batı Nil Virüsü Epidemiyolojisi.....	14
2.6.1. Türkiye’de BNV Epidemiyolojisi.....	16
2.6.2. Bulaş Yolları.....	18
2.7. Patogenez	20
2.8. Batı Nil Virüsü Enfeksiyonunun Klinik Özellikleri.....	22
2.9. Kan transfüzyonu açısından Batı Nil Virusunun Önemi.....	23
2.10. Tanı.....	24
2.10.1. Virüs İzolasyonu	26

2.10.2. Antijen Testleri	26
2.10.3. Moleküler Testler	26
2.10.4. Serolojik Testler	27
2.11. Tedavi	28
2.12. Korunma	29
2.13. Aşı	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kan Donörleri	32
3.1.1. Etik Kurul Onayı	32
3.1.2. Donörlerin Seçimi/Bilgilendirilmesi ve Örneklerin Toplanması	32
3.2. Örneklerin Alınması İşlenmesi Ve Saklanması	33
3.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virüsü (BNV) IgG ve IgM Antikorlarının Araştırılması	33
3.3.1. ELISA Yöntemi ile BNV özgül IgG ve IgM Antikorlarının Araştırılması	33
3.3.2. ELISA IgG için Cut-off hesaplanması	35
3.3.3. ELISA IgM için Cut-off hesaplanması	36
3.4. Serum Örneklerinde Batı Nil Virüsü (BNV) IgG ve IgM Antikor Varlığının Doğrulanması	36
3.4.1. İndirekt İmmüno Floresan Antikor (IIFT) Testi	36
3.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testi ile Viral RNA Araştırılması	38
3.5.1. BNV Viral RNA Ekstraksiyon	38
3.5.2. BNV Viral RNA Kantitasyon Testi	40
3.5.2.1. Reaksiyon Bileşenleri ve Karışımların Hazırlanması	40
3.5.2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi	42
4. BULGULAR	43
4.1. Kan Donörlerinin Demografik Bulguları	43
4.2. Batı Nil Virüsü (BNV) ELISA IgM ve IgG Antikor Bulguları	44
4.3. Batı Nil Virüsü (BNV) İndirekt İmmüno Floresan Antikor (IFA) Testi Bulguları	46
5. TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	59
FORMLAR	69
ETİK KURUL KARARI	71
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLULAR LİSTESİ

Tablo	Sayfa
3-1 Reaksiyon bileşenleri ve hacimleri	41
3-2. Termal protokol	41
4-1. Donörlerin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı	43
4-2. BNV ELISA IgM/IgG pozitifliği saptanan örneklerin kantitatif değerleri ve demografik verileri	45
4-3. BNV IgM pozitifliği saptanan örneklerin yarı kantitatif değerlendirmeleri ve demografik verileri	48
4-4. BNV IgG pozitifliği saptanan örneklerin IFA/ELISA test sonuçları ve demografik verileri	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2-1	Batı Nil Virüsü'nün dünya genelinde dağılımı	4
Şekil 2-2	Japon ensefaliti serokompleksinde yer alan virüslerin dağılımı	6
Şekil 2-3	Batı Nil Virüsü Filogenetik Sınıflandırması	7
Şekil 2-4	Batı Nil virüsü şematik yapısı ve elektron mikroskopisi görünümü	8
Şekil 2-5	Batı Nil virüsü genomik yapısı ve proteinleri	9
Şekil 2-6	Batı Nil virüsü replikasyon döngüsü	11
Şekil 2-7	Batı Nil Virüsü Bulaş Döngüsü	13
Şekil 2-8	BNV salgınları ve kuşların ana göç yolları	15
Şekil 2-9	Virüsün deri içine girişi ve BNV enfeksiyonunun başlangıç patogenezi	22
Şekil 2-10	Batı Nil virüs ensefalitinde viral ve serolojik göstergeler	25
Şekil 3-1	Real Time PCR cihazında 10000, 1000, 100, 10, 2 kopya/µl konsantrasyonlara sahip beş adet kantitasyon standartlarının görünümü	42
Şekil 4-1	BNV IFA IgM ve IgG yönteminde Pozitif ve Negatif kontrol serumlarının görünümü	47
Şekil 4-2	Çalışmada antikor pozitifliklerinin illere göre dağılımı	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALFV	Alfuy virüs
BNV (WNV)	Batı Nil virüsü
C	Kapsid (Capsid)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CF	Kompleman Fiksasyon
CPCV	Cacipacore virus
CPE	Sitopatik Etki
CTF	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
DEET	N,N- dietil-m-toluamid
dH ₂ O	Distile su
E	Zarf (Envelope)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENIVD	European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases
ER	Endoplazmik Retikulum
FDA	Food and Drug Administration
H	Hafta
IFA	İmmün Floresan Antikor
IFN- β	Interferon Beta
IFN- α/β	Interferon Alfa/Beta
IIFT	Indirect Immunofluorescence Test
JEV	Japon ensefaliti virüsü
KOC	Kocaeli
KOUV	Koutango virüs
M	Membran
MAC-ELISA	IgM-Antibody Captured-ELISA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MVEV	Murray Valley ensefaliti virüsü
nm	Nanometre

NS	Non- structural
NTP-az	RNA trifosfataz
OD	Optik Dansite
PBS-T	Phosphate-buffered saline + Tween-20
PCR	Polimerase chain reaction
PrM	Öncü Membran
PRNT	Plak redüksiyon nötralizasyon testi
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction
RU/ml	Relatif ünite/mililitre
RU/ul	Relatif ünite/mikrolitre
SAK	Sakarya
SLEV	Saint Louis ensefaliti virüsü
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TRK	Trakya
USUV	Usutu virüs
VLP	Virus-Like Particles Virüs (Virüs benzeri partikül)
YAOV	Yaounde virüs

ÖZET

Bakır, E. Batı Nil Virüsü Varlığının Marmara Bölgesi Kan Donörlerinde Serolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

Batı Nil Virüsü (BNV), Flaviviridae ailesinin Flavivirus cinsine ait olan Japanese Encephalitis serokompleksinde, pozitif polariteli, zarflı RNA virüsüdür. Tüm Batı Nil Virüsü izolatları tek bir serotip oluşturur ve kökenlerin çoğu amino asid dizilerinin ifadesine ve zarf protein dizilerindeki değişikliklere dayanılarak genellikle 2 köken içerisinde gruplandırılmıştır. Özellikle *Culex* sp. cinsi sivrisineklerin insanları ısırmasıyla bulaşan BNV enfeksiyonlarının önemli bir kısmı asemptomatik seyretmekle birlikte MSS bulguları ve meningoensefalite tablosu gelişmektedir. 1999 yılına kadar BNV'nin coğrafi dağılımı Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan, Batı ve Orta Avrupa ile sınırlı olmasına karşın; virüs 1999'da ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde saptanmıştır. Asemptomatik olarak seyreden ve viremi semptomlar başlamadan sona eren BNV etkeninin araştırılması gerekliliğine dair çalışmalar bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında BNV taşıyıcısı olan kuşların göç yolları üzerinde yer alan "Marmara Bölgesi" seçilerek BNV seroprevalansının saptanması ve kan donörlerinde virüs aktivitesinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. 15 Haziran ile 15 Eylül 2014 tarihleri arasında İstanbul, Edirne, Sakarya ve Kocaeli illerinde bulunan kan merkezlerine başvuran sağlıklı kan donörlerinden (yaş aralığı: 20-60, ortalama: 33.87) 226 serum ve plazma örneği toplanmıştır. Bu kapsamda donörlere epidemiyolojik risk faktörlerinin sorgulandığı anket formu doldurulmuştur. Toplanan örneklerin 84'ü İstanbul iline, 60 örnek Edirne iline, 58 örnek Kocaeli iline ve 24 örnek Sakarya iline ait olup serum örneklerinde BNV IgG ve IgM antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. BNV IgG ve IgM antikor pozitifliğinin teyit edilmesi ise, indirekt immüno Floresan antikor (IFA) testi ile yapılmıştır. ELISA yöntemi ile BNV antikor (IgM ve IgG) varlığı aranan örneklerin 2 (%0,9)'sinde özgül BNV IgM antikor pozitifliği ve 2 (%0,9) örnekte BNV IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. ELISA ile negatif bulunan fakat anket verileri incelendiğinde arboviral enfeksiyonlar açısından yüksek risk faktörlerini bulundurduğu kabul edilen 42 donöre ait örneğe IFA testi uygulanmış ve 42 örneğin 4 (%9,5)'ünde (9,5) IgM antikor pozitifliği, 4 (%9,5)'ünde ise IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. Tüm plazma örneklerinde BNV RNA negatif bulunmuş olmasına rağmen bölgede saptanılan seropozitiflikler sebebiyle virüsün sirkülasyonda olduğu ve kan ürünleriyle bulaş riski göz ardı edilmemelidir. Bu alanda daha geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Batı Nil virüsü, kan donörü, seroprevalans, ELISA, IFA, PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 44297

ABSTRACT

Bakır, E. Batı Nil Virüsü Varlığının Marmara Bölgesi Kan Donörlerinde Serolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

West Nile virus (WNV) is an enveloped positive-sense RNA virus classified in Japanese encephalitis serocomplex of Flavivirus genus in the family of Flaviviridae. Sequencing and phylogenetic studies have shown that WNV can be divided into two major genetic lineages. WNV is transmitted to humans by mainly *Culex* sp. infected mosquito bites. Although significant number of WNV infections ends by asymptomatic, causes Central Nervous System symptoms and meningoencephalitis affects in less than 1% of cases. Geographical distribution of WNV was limited Africa, the Middle East, India, western and central Europe until 1999, however, the virus has been detected in United States for the first time. Studies have been reported on the regarding the investigation of WNV effects in which asymptomatic and symptoms end before starting viremia. In this study; it is aimed detection of WNV seroprevalence and determination of virus activity in blood donors selecting the Marmara Region which located on the migration route of birds with infected WNV (between June 15– September 15, 2014). 226 sera and plasma samples were obtained from healthy blood donors (age range: 20-60, mean age: 33.87) who were admitted to blood centers in Istanbul, Edirne, Sakarya, and Kocaeli. 84 samples from Istanbul, 60 samples from Edirne, 58 samples from Kocaeli and 24 samples from Sakarya were obtained. In this context, questionnaire form was filled to donors which questioned epidemiological risk factors. The presence of WNV IgM and IgG antibodies in the sera samples were screened by ELISA. Indirect immunofluorescence antibody (IFA) test were performed for confirmation of WNV IgM and IgG positive results. 2 (0.9%) sera samples were found WNV IgM positive and 2 (0.9%) sera samples were found WNV IgG positive by ELISA. 42 sera sample, had found negative by ELISA but when data survey were examined which have high risk factors for arboviral infections, were also investigated by IFA. 4 (9.5%) sera samples WNV IgM and 4 (9.5%) sera samples WNV IgG have been determined positive. All samples were investigated by real time RT-PCR however were found negative. Even though we couldn't detect WNV RNA presence in plasma samples, because of detected seropositivity results in the region, circulation of the virus and risk of WNV transmission with blood products shouldn't be ignored. Therefore, further comprehensive studies on this issue are needed.

Key Words: West Nile virus, Blood donors, seroprevalence, ELISA, IFA, PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 44297

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Batı Nil virüsü ilk kez 1937 yılında Uganda'nın kuzeyindeki Batı Nil bölgesinde ateşli hastalık geçiren bir kadının kanından izole edilmiştir. İnsanlar, atlar, kuşlar ve vahşi hayvanlarda çeşitli nörolojik semptomlara neden olan virüsün taksonomik özellikleri incelendiğinde, *Flaviviridae* ailesinin *Flavivirus* cinsinde yer almaktadır. BNV ayrıca bu ailede yer alan Japanese Encephalitis virüsü (JEV) serokompleksi ile yakın antijenik ilişkilidir(1,2,3)

BNV tek sarmallı, zarflı, yaklaşık 50 nm dolaylarında pozitif polariteli RNA'ya sahip bir virüstür. Virüsün genomu tek zincirli RNA yapısında olup, 11000–12000 nükleotidden oluşmaktadır. Yapılan filogenetik çalışmalar sonucu BNV izolatlarının zarf (envelop, E) proteinlerindeki aminoasit değişiklikleri ve delesyonlara göre iki farklı genotipte izolatlara sahip oluşu belirlenmiştir. Genotip 1 BNV izolatları tüm dünyada yaygın dağılıma sahip olmaktadır, aynı zamanda hem virülan hem de atenüe suşları içermektedir. Genotip 2 ise özellikle Sahra Altı Afrika ve Madagaskar'da bulunan suşları içermekte olup Genotip 1'e ait suşlara göre daha az virülan özellikte olduğu kabul edilmektedir (4,5).

BNV genomu tarafından üretilen viral proteinlerden üçü yapısal (kapsid [C], premembran [prM]/membran [M] ve zarf [E]), yedisi yapısal olmayan (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b ve NS5) proteinlerdir. BNV yapısal proteinleri viral partikül oluşumunda rol alırken yapısal olmayan viral proteinler, virüsün transkripsiyon, translasyon ve replikasyon mekanizmalarının düzenlenmesinden sorumludur ve konak antiviral yanıtını zayıflatırlar (6).

Virüs öncelikle enfekte kuşlardan beslenme yoluyla enfekte olan sivrisinek vektörlerin, insanların ısırılmaları ile bulaşır. BNV'nin doğadaki enzootik döngüsü, primer vektör *Culex* cinsi sivrisinekler ile kuşlar arasındaki bulaş döngüsünün korunması ile gerçekleşir. Bu sebeple *Culex* sp. cinsi sivrisinekler taşınma siklusunda en önemli vektörlerdir. Memelilerde kısa süreli viremi görülmesi sebebiyle bulaş döngüsünde önem taşımazlar. Enfeksiyonun görüldüğü atlar ve insanlar, daha çok tesadüfi konak (*dead-end host*) olarak kabul edilmektedirler. Virüsün omurgalılara bulaşı öncelikle arthropod vektörler yoluyla olmasına rağmen arthropod vektörler dışında, organ

transplantasyonu, kan transfüzyonu, emzirme, intrauterin bulaş ve iğne batması şeklinde çeşitli yollarla da bulaştığı bildirilmiştir (7,9).

BNV ile enfekte hastaların yaklaşık %80'inde hastalık asemptomatik seyrederken hastaların %20'sinde BNV ateşi gelişmektedir. Hastaların yaklaşık %1'inde de menenjit, ensefalit ve akut gevşek paralizi ile seyreden nöroinvaziv hastalık gelişmektedir. Nöroinvaziv olguların %55-60'ının ensefalit ile sonuçlandığı, bunun da %20'sinin ölüm ile seyrettiği tahmin edilmektedir (8).

BNV enfeksiyonlarının tanısında virüsün izolasyonu, viral antijen tayini ya da nükleik asidin saptanması ve virüse karşı oluşan özgül immün yanıtın gösterilmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik tanıda JE kompleksi ile çapraz reaksiyon verebileceğinden yalancı pozitif sonuçlar görülebilmektedir. Bu nedenle, (plak reduksiyon nötralizasyon testi) PRNT testi ile gerekli doğrulamalar yapılmalıdır. Virüs izolasyonu virüsün tanısı için altın standart olarak kabul edilmektedir (10).

Avrupa ve Akdeniz havzası gibi endemik bölgelerde ve Amerika'da BNV enfeksiyonlarının artmasıyla birlikte insan ve at popülasyonlarını etkileyen geniş salgınlar bildirilmektedir. Ülkemizin son yıllarda salgınların görüldüğü Yunanistan ile yakın komşu olması ve kuş göç yolları üzerinde bulunması ve bu bölgede bulunan illerde BNV vakalarının ağırlıklı olarak görülmesi, ülkemizde BNV enfeksiyonunun düşükte olsa aktivite gösterdiğine işaret etmektedir. 2010-2011 yılları arasında Türkiye'de ilk kez insanlarda Manisa ve Sakarya illerinde akut BNV enfeksiyonu olguları saptanmış ve uluslararası bildiri yapılarak belgelenmiştir (11,12).

BNV'nin ülkemizde sirkülasyonu bilinmesine karşın, ülkemizde seroprevalansının özellikle batısındaki dağılımına ilişkin sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızın amacı; Marmara Bölgesi'nde ikamet eden ve çalışma kapsamındaki kan merkezlerine başvuran sağlıklı kan donörlerinde BNV varlığının araştırılması ve kan bankacılığında taranması gereken risk faktörlerinden olup olmadığı hususunda katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

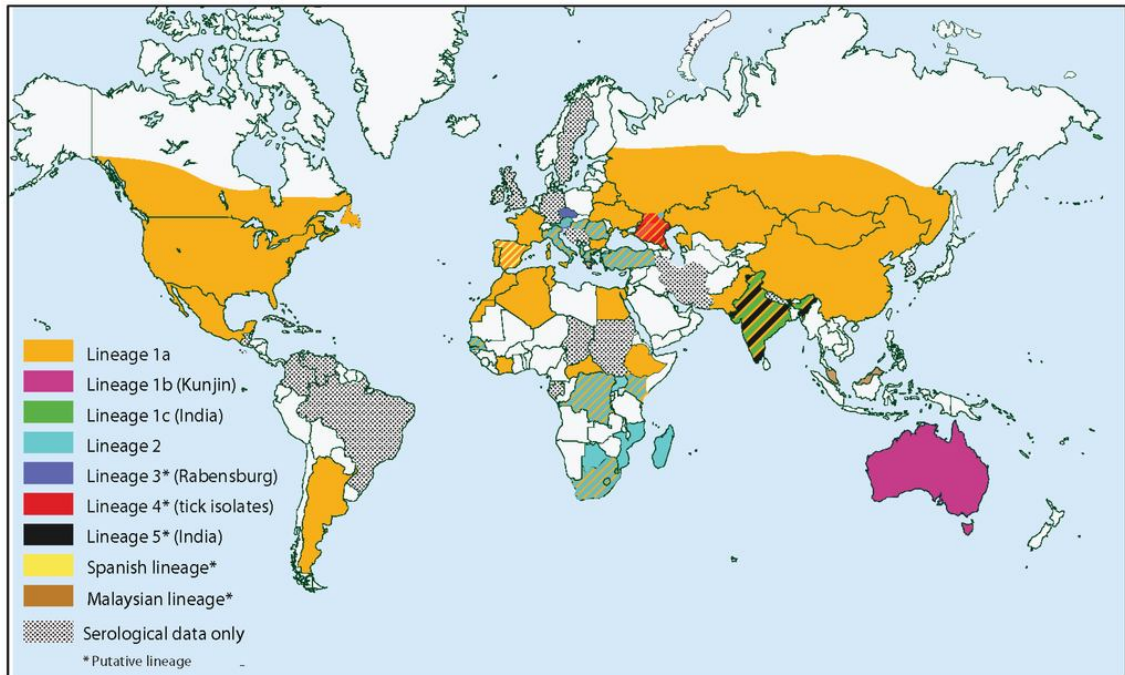
Batı Nil virüsü (BNV) insanlar, atlar, kuşlar ve vahşi hayvanlarda çeşitli nörolojik semptomlara neden olan, sivrisinekler gibi artropod (eklembacaklı)'lar yoluyla bulaştığı için arbovirüs (Arthropod Borne) olarak adlandırılan virüs grubunda yer alan, günümüzde yeniden önem kazanmış olan bir RNA virüsüdür. BNV insan, köpek, at, kuş gibi çeşitli konak türlerinde özellikle merkezi sinir sistemi (MSS)'ni enfekte ederek hafif bir klinik tablodan menenjit, ensefalit veya ölüme kadar uzanan ciddi nörolojik klinik tablolara kadar uzanan geniş bir spektrumda hastalığa neden olabilmektedir (1,2).

Batı Nil virüsü ilk kez 1937 yılında Uganda'nın kuzeyindeki Batı Nil bölgesinde ateşli hastalık geçiren bir kadının kanından izole edilmiştir (3). Hasta, sarıhumma virüsüne ait geniş epidemiyolojik çalışmaların yapıldığı bölgede bulunmuştur. Ancak hasta serumunun fareye inokülasyonu virüsün izole edilmesi sonucunda 2 virüse ait - Saint Louis Encephalitis virüsü (SLEV) ve Japon ensefalit virüsü (JEV)- fiziksel ve patolojik özelliklerde benzerlikler olduğu ve bu virüslerle ortak immünolojik bağlantılar olduğu görülmüştür. İndeks olguda yalnızca ateş olmasına rağmen yeni keşfedilen virüs ile yapılan ilk çalışmalar virüsün patogenezinin öncelikle MSS'yle ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin virüsün nörotropik özelliğine işaret ettiğini göstermiştir (4). Virüsün epidemiyolojisi ve ekolojisi ise ilk kez 1950'li ve 1960'lı yıllarda Akdeniz Havzası'ndaki salgınlarda ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Bilinen ilk salgın 1951 yılında İsrail'de Hayfa dışında küçük bir kasabada ortaya çıkmıştır. Etkenin insanlarda ve atlarda neden olduğu nörolojik bozukluklar 1950'li yılların sonlarında bildirilmiştir. 1951 ve 1954 yılları arasında Mısır'daki salgınlar virüsün ekolojisini, epidemiyolojisini ve klinik özelliklerini anlamada daha da öncülük etmiştir (5). Hayvanlar arasında yapılan serolojik çalışmalarda virüsün kuşlarda ve insan harici memeli türlerinde infeksiyöz olduğu gösterilmiştir. BNV nötralizan antikörlerin özellikle kargalar olmak üzere kuşlar arasında yaygın olduğu gösterilirken insan hariç birçok memeli türünde de infeksiyöz olduğu fakat özellikle atlarda sıklıkla semptomatik ve ölümcül olduğu bulunmuştur (7).

Mısır'da keşfedilen virüs yalnızca sivrisineklerden izole edilmiş olup diğer artropodlardan izole edilmemiş olması nedeniyle sivrisineklerin birincil vektör oldukları görüşünü ileri sürdürmüştür. Bu görüş, konaktan beslenmeyle başlayan enfeksiyonun vektör döngüsünü yalnızca sivrisineklerin sürdürebildiğinin ve virüs bulaşımının sivrisineklerin ısırmasıyla aktarılmaya devam ettiğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Böylece *Culex* cinsi sivrisineklerin birincil vektör olduğu ortaya konulmuştur (13,5).

Literatürde kayıtlı ilk epidemi 1951 yılında İsrail'den bildirilmiş olup, ardından 1954 ve 1957 yıllarında da salgınlar görülmüştür. BNV 1957'deki İsrail salgınında yaşlı hastalarda meningoensefalit etkeni olarak gösterilmiş. Sonraki yıllarda Fransa'da, 1974 yılında Güney Afrika'dan salgınlar bildirilmiştir. Rusya'da, İspanya'da, Güney Afrika'da ve Hindistan'da takip eden yıllarda nadiren de olsa benzer salgınlar görülmüştür (14).

1970'li yıllardan 1980'li yılların sonuna kadar salgınlar çok seyrek olarak görülmüştür. 1990'lı yılların ikinci yarısından sonra BNV epidemiyolojisinde ve klinik spektrumunda değişiklikler ortaya çıkmıştır. 1996 yılında Romanya'da ve Bükreş'te ciddi BNV epidemileri ortaya çıkmış ve ağırlıklı olarak kentsel merkezli salgınlar olarak kaydedilmiştir. Ayrıca bu salgınlar semptomatik MSS enfeksiyonlarının üstünlük göstererek ön plana çıktığı ilk salgınlardır (4). Meningoensefalit tablosunun ön plana çıktığı salgınlar Fas (1996/2003), Tunus (1997), İtalya (1998), Rusya (1999) ve İsrail (1998-2000)'den bildirilmiştir (15) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Batı Nil Virüsü'nün dünya genelinde dağılımı (106)

1999 yılına kadar BNV'nin coğrafi dağılımı Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan, Batı ve Orta Avrupa ile sınırlı olmasına karşın; virüs 1999'da Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez saptanmış ve geçen zaman içinde tüm kıtaya hızla yayılarak önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (8). Virüsün batı yarımkürede tespit edilmesi New York şehrinde insanlarda görülen ensefalit salgını sırasındadır. Salgının görüldüğü bölgede meningoensefalit ve flasid paralizi gelişen 59 olgunun ortaya çıkması üzerine yapılan epidemiyolojik ve çevresel analizler, artropod kaynaklı bir virüsü (arbovirüs) işaret etmiştir. İnsan ölümleri ile ortaya çıkan salgının sorumlusunun önce St. Louis ensefalit (SLE) virüsü olduğu düşünülmüş; ancak aynı dönemde şehir içinde çok sayıda ölü ve ölmek üzere olan kuşların olması ve SLE virüsünün kuşları enfekte etme özelliğinin olmaması, dikkatlerin başka bir arbovirüs üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından yapılan çalışmalarla, etken Batı Nil virüsü olarak tanımlanmış ve bu suşun 1998 yılında İsrail'de dolaşan virüs ile homolog olduğu belirlenmiştir (16).

2002 yılında Amerika'daki BNV vakalarında çarpıcı ve beklenmedik bir artış ile 284 ölüme sebep olan 4156 insan enfeksiyonu vakası bildirilmiştir (17). Bu vaka sayısındaki ani artışın muhtemelen ABD'deki iklim koşullarının sivrisinek çoğalmasını desteklemesi ile virüs yayılımının en güneydeki eyaletlere sıçraması sonucu olduğu düşünülmektedir. Virüsün, 2002 yılı itibarıyla Kanada ve Kolombiya, Karayipler ve Meksika gibi Güney Amerika ülkelerine yayılımı ile Amerika kıtası da, BNV enfeksiyonları için endemik bölge haline gelmiştir (17,1).

2.2. Virüsün sınıflandırması

BNV'nin taksonomik özellikleri incelendiğinde, *Flaviviridae* ailesinin *Flavivirus* cinsinde yer almaktadır. *Flavivirus* cinsi içinde yer alan virüsler klasik serolojik kriterlere göre antijenik özelliklerine dayanılarak farklı antijenik komplekslere ve alt komplekslere; modern filogenetik yöntemler ile de kollara, gruplara ya da türlere ayrılmaktadır. BNV ayrıca bu ailede yer alan Japanese Encephalitis virüsü (JEV) serokompleksi içinde yer almaktadır ve yakın antijenik ilişkilidir. Bu sebeple JEV ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. JE'nin diğer üyeleri arasında, Murray Valley encephalitis virus (MVEV), Saint Louis encephalitis virüsü (SLEV), Koutango virus (KOUV), Cacipacore virus (CPCV), Alfuy virus (ALFV), Yaounde virus (YAOV),

Usutu virus (USUV) ve Kunjin virus bulunmaktadır. Özellikle Kunjin virüs antijenik ve genetik benzerlik yönünden BNV'nin alt tipi olarak tanımlanmaktadır (18) (şekil 2-2).

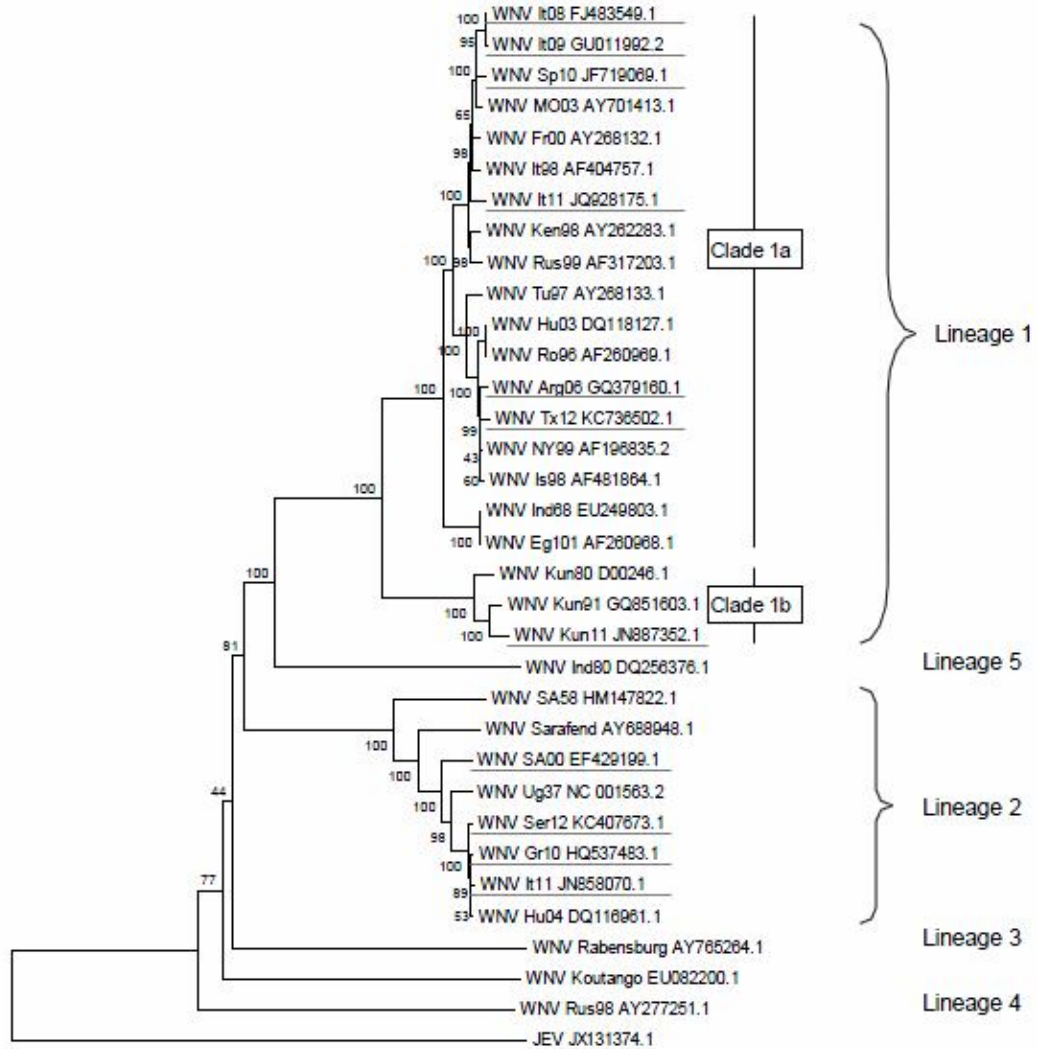
Yapılan filogenetik çalışmalar sonucu BNV izolatlarının zarf (envelop, E) proteinlerindeki aminoasit değişiklikleri ve delesyonlara göre iki farklı genotipte izolatlara sahip oluşu belirlenmiştir. Genotip 1 BNV izolatları tüm dünyada yaygın olarak görülen, aynı zamanda hem virülan hem de atenüe suşları içermektedir (19,20). Genotip 1 izolatları dağılımlarına göre 3 alt dalda (clade) gruplandırılmıştır.

Virüs	Kısaltması	Coğrafi Dağılımı
Cacipacore	CPC	Güney Amerika
Koutango	KOU	Afrika
Japanese encephalitis	JE	Asya
Murray Valley encephalitis	MVE	Avustralya
Alfuy	ALF	Avustralya
St. Louis encephalitis	SLE	Kuzey Amerika
West Nile encephalitis	WN	Güney Amerika Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey Amerika
Kunjin	KUN	Avustralya
Yaounde	YAO	Afrika

Şekil 2-2: Japon ensefaliti serokompleksinde yer alan virüslerin dağılımı (104)

Genotip 1-1a dağılımı Afrika, Avrupa, Asya ve Amerika suşlarını içerirken, Genotip 1-1b Avustralya'da saptanan Kunjin virus suşlarını ve Genotip 1-1c ise Hindistan suşlarını içermektedir. Genotip 2 ise özellikle Sahra Altı Afrika ve Madagaskar'da bulunan suşları içermektedir (Şekil 2-3). Genellikle asemptomatik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir ve Genotip 2'ye ait suşların, Genotip 1'e ait suşlara göre daha az virülan özellikte olduğu kabul edilmektedir. Fakat yakın dönemde Avrupa'da Genotip 2'ye ait birkaç virülan suş saptanmıştır (21). Son yıllarda Güney Afrika suşlarının ciddi ensefalit olguları ile ilişkili olduğu da bildirilmektedir. Genotip 1'e ait BNV suşları ciddi insan hastalıklarına sebep olmaktadır ve bu suşların genellikle nöroinvaziv hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Son çalışmalarda ise her iki suşunda yüksek ve düşük nöroinvazivite ile ilişkili fenotiplerin olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda başka genetik kökenlerin varlığı da bildirilmiştir. Her iki suşun virülan

ve attenüe türleri içermekte olup, patojenitelerindeki farklılığın, virüsün prM, E veya yapısal olmayan proteinlerindeki spesifik bölgeleri kodlayan nükleotidler ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (22).



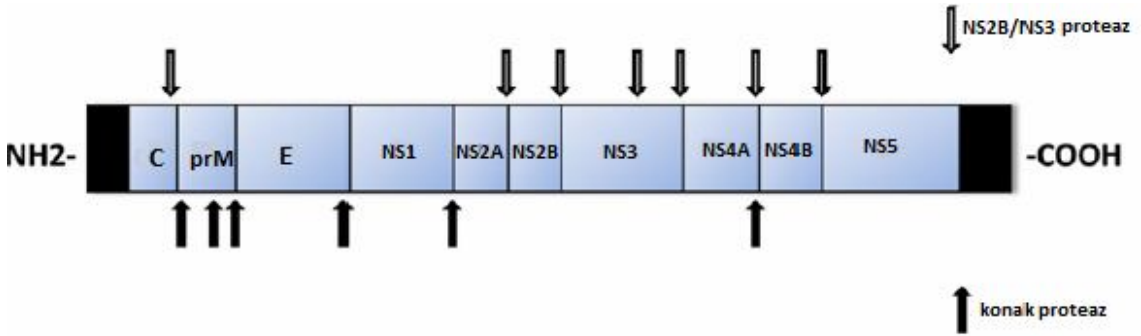
Şekil 2-3: Batı Nil Virüsü Filogenetik Sınıflandırması (103)

2.3. Virüsün Yapısı ve Genomik Organizasyonu

BNV tek sarmallı, zarflı, yaklaşık 50 nm dolaylarında pozitif polariteli RNA'ya sahip bir virüsdür. Virüsün genomu tek zincirli RNA yapısında olup, 11000–12000 nükleotidden oluşmaktadır. Viral serin proteazlar ve çeşitli hücrel proteazlar tarafından tek bir poliprotein proteolitik olarak ayrışması ile 10 olgun viral protein üretilmektedir. Bunlardan üçü yapısal (kapsid [C], premembran [prM]/membran [M] ve zarf [E]), yedisi viral replikasyona katılan yapısal olmayan (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b ve NS5) proteinlerdir (22). Viral poliproteinler çoklu transmembran

2.3.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP)

Yapısal olmayan viral proteinler, virüsün transkripsiyon, translasyon ve replikasyon mekanizmalarının düzenlenmesinden sorumludur ve konak antiviral yanıtını zayıflatırlar. NS1 proteini, viral RNA replikasyonunda kofaktör olarak işlev görür ve BNV ile enfekte hastaların serumlarına yüksek miktarlarda (> 50ug/ml) salınan tek yapısal olmayan proteindir. Ayrıca hastalığın şiddeti ile bağlantılıdır. NS2A, RNA replikasyonu ve viral partiküllerin olgunlaşmasında önemli rol oynayan, hidrofobik, çok fonksiyonlu zara bağlı bir proteindir. Aynı zamanda interferon beta (IFN-β) transkripsiyonunun ana baskılayıcısı olarak işlev görür ve böylece IFN-β yanıtını inhibe etmiş olur. NS2B, NS3 proteolitik aktivitesi için gerekli kofaktör proteindir. NS3 ise çok fonksiyonlu bir protein olarak helikaz, proteaz ve NTPaz aktivitesine sahiptir. NS3 proteininin viral proteaz aktivitesi, yapısal olmayan proteinleri, viral proteinlerden ayırma, enzim aktivitelerini kodlama ve bu fonksiyonları yaygın şekilde karakterize etme şeklindedir. NS3 ve NS2B kompleksinin zarla ilişkisi etkili poliprotein işlemleri için gereklidir. NS4A endoplazmik retikulum modifikasyonu ve hızlı yayılımından sorumlu iken; NS4B interferon yanıtını bloke eder. NS5 en büyük ve korunmuş flavivirus proteindir ve viral poliproteinlerin C-uç bölgesinde konumlanmıştır. NS5 proteininin N-uç bölgesi S-adenozil metionin metil transferazı kodlar. C-uç bölgesi ise RNA ya bağımlı RNA polimerazı kodlar (27) (Şekil 2-5).

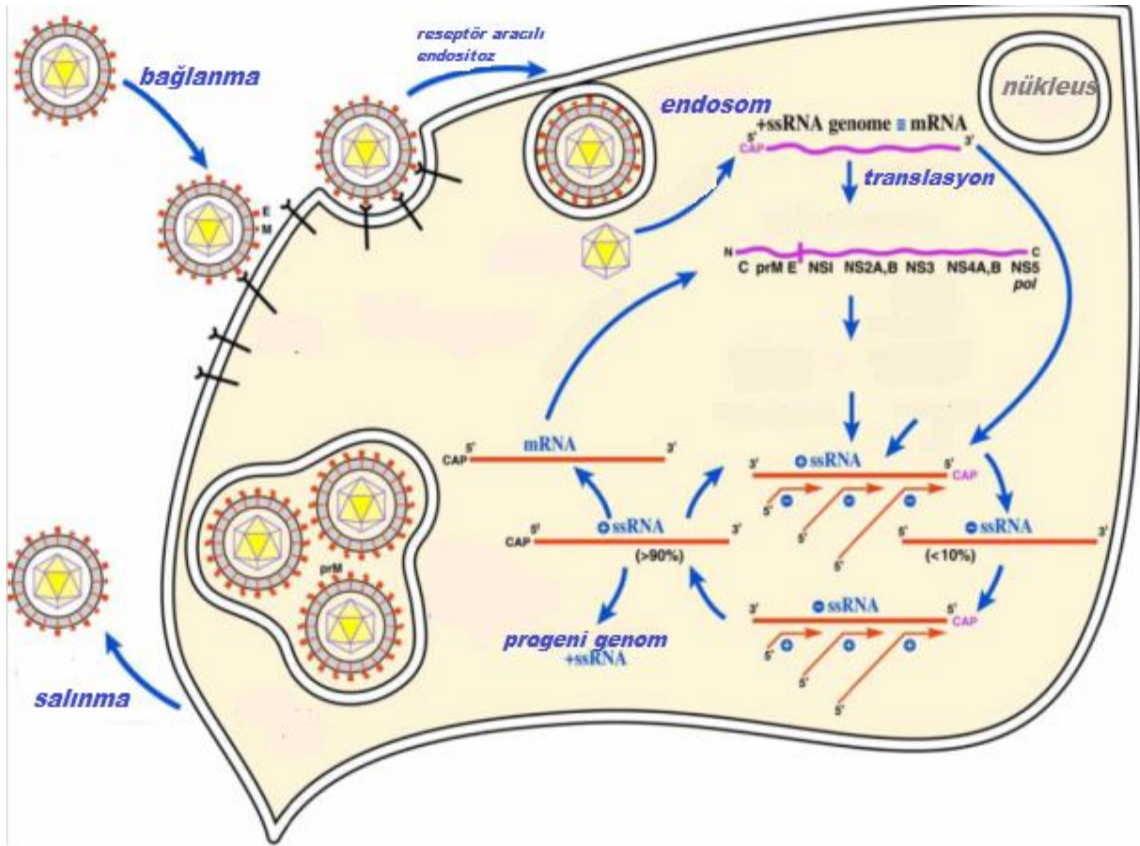


Şekil 2-5: Batı Nil virüsü genomik yapısı ve proteinleri (27)

2.4. Virüsün Replikasyon Döngüsü

BNV kültürde, çeşitli primer hücrelerde ve kuş, memeli, amfibi ve böcek türlerinden elde edilmiş çok çeşitli devamlı hücre hatlarında replike olabilmektedir. Bu durum, virüsün hücreye girişte yüksek ölçüde korunmuş reseptörleri ve hücreye giriş moleküllerini kullandığını ya da bu seçeneklerden birini düşündürmektedir. Bu

düşünceye alternatif olarak, BNV nin farklı hücre tiplerinde ve konak türlerinde bu fonksiyonları gerçekleştirmek için farklı hücrel proteinleri kullandığı düşünülmektedir (28). Virüsün kullandığı reseptörler tam olarak bilinmemekle beraber, *in vitro* koşullarda hücre yüzeyinde bağlandığı çeşitli proteinler DC-SIGN, DC-SIGNR ve integrin $\alpha\beta 3$ olarak bildirilmiştir (29). Virüs hücreye tutunduktan sonra hücre içine klattrin aracılı endositoz yolu ile girmektedir. Endozomun asidifiye olması ile birlikte E proteinin 3 boyutlu yapısı değişir ve bu olay virüs ile hücre membranının füzyonu ile sonuçlanır. Viral nükleokapsid sitoplazmaya serbestlenir. Pozitif tek iplikli viral RNA doğrudan mRNA görevi üstlenir ve translasyonu sonucu büyük tek molekül halinde bir poliprotein öncülü sentezlenir. Daha sonra hücrel ve viral proteazların etkisi ile 3 adet yapısal (zarf proteini; E, öncül membran proteini; prM ve kapsid proteini; C) ve 7 adet yapısal olmayan protein (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ve NS5) açığa çıkar. Protein kesiminin bir kısmını endoplazmik retikulum lümeninde bulunan konağa ait sinyal peptidaz enzimi gerçekleştirirken geri kalan peptid bağlarını virüse ait NS3 proteazı keser. Genom replikasyonu virüs proteini ve bunları çevreleyen konak membranından oluşan replikasyon kompleksi adı verilen yapılar içinde gerçekleşir. NS5 bölgesinin kodladığı RNA-bağımlı-RNA polimeraz enzimi pozitif sarmalı kalıp olarak kullanarak zıt polariteli negatif RNA sarmalını sentezler. Bu negatif sarmal da infeksiyöz pozitif sarmalın sentezlenmesinde kalıp olarak kullanılır. BNV'nin toparlanması virüsün indüklediği ER kaynaklı membranlar içinde gerçekleşir ve virüs tomurcuklanması immatür viryonların lümenine atılması şeklindedir (30,6).



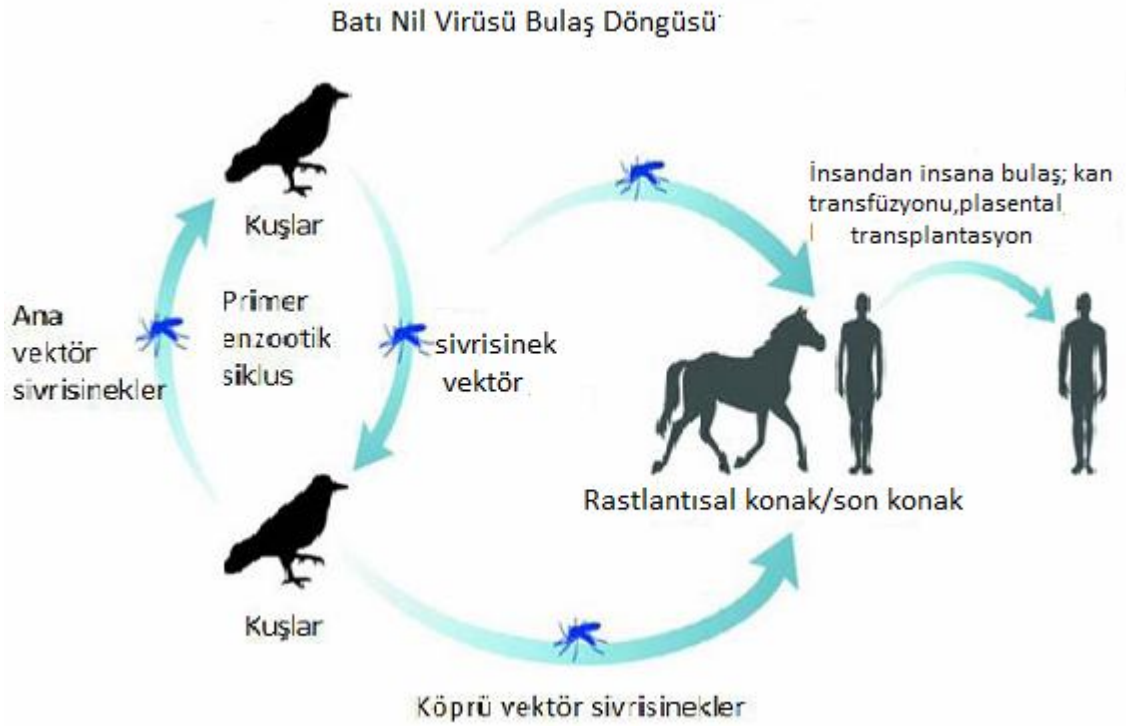
Şekil 2-6: Batı Nil virüsü replikasyon döngüsü (27)

İmmatür virionda E ve prM proteinleri heterotrimerik dikensi yapılarıdır. ER-golgi sekresyon yolunda hafif asidik kompartmanlardan geçerken E proteinlerinde yapısal değişimler olur ve virüs yüzeyindeki E proteinleri anti paralel dimerler olarak düzleşir. Asidik koşullarda prM virionda bağlı kalır ve viryon yüzeyinde çıkıntı oluşturur. PrM proteinlerinin virüs yüzeyinde çıkıntı oluşturması bu proteinin konağa ait furin benzeri serin proteazlar tarafından kesilmesini kolaylaştırır. prM proteinin kesilerek uzaklaştırılması ile virüsün olgunlaşma süreci tamamlanır. Olgun virüs ekzositoz yolu ile hücreden dışarı salınır (23,31) (Şekil 2-6). Enfekte hücrelerde çok yüksek miktarlarda protein sentezlenmesi durumunda ER stresi indüklenebilir, böylece UPR (unfolded protein response) olarak bilinen sinyal ağı aktive olur. UPR en az üç farklı mekanistik sinyal yolağı ile çok sayıda genin sentezini düzenler. Böylece ER içinde protein hemostazı sürdürülmüş ya da apoptozis indüklenmiş olur (32). Her bir virion, E ve prM yapısal proteinlerin her biri için 180 kopya ve bir genomik kopya içermelidir. Yeterli miktarda protein sentezinin yapılmadığı durumda virion olgunlaşması gerçekleşmemektedir (33).

2.5. Virüsün Yaşam Döngüsü

BNV'nin doğada kalışı, 300'den fazla konak kuş türü ile kuşlardan kan emen birçok sivrisinek türünün vektörlüğü vasıtası ile olmaktadır. Kuşlar, virüsün doğal olarak çoğaldığı birincil konaklarıdır. Özellikle kaz, tavuk, kırlangıç ve güvercinlerde yüksek prevalanstan söz edilmektedir. Virüs öncelikle enfekte kuşlardan beslenme yoluyla enfekte olan sivrisinek vektörlerin, insanları ısırması ile bulaşır. Virüsün bulaş yoğunluğu, enfekte sivrisineklerin beslenme alışkanlıkları ve sivrisinek yoğunluğu ile bölgesel ekolojiye bağlıdır. Bu faktörler insanın enfekte sivrisineğe maruz kalma sıklığını etkilemektedir. BNV'nin doğadaki varlığı, primer vektör *Culex* cinsi sivrisinekler ile kuşlar arasındaki enzootik bulaş döngüsü ile korunur. Bu sebeple *Culex* türü sivrisinekler taşıma siklusunda en önemli vektörlerdir (9).

Virüs, memeli canlılarda yüksek viremi oluşturmadığından dolayı, bulaş döngüsünde önem taşımazlar. Enfeksiyonun görüldüğü at ve insanlar, daha çok tesadüfi konak (*dead-end host*) olarak kabul edilir, düşük ve kısa süreli viremi oluştururlar. Böylece virüs insanların ve atların kanında çok miktarda çoğalamadığından enfekte olan at ve insanları ısırarak sivrisinekler virüsü başkalarına taşıyamazlar, böylece virüsün insan ve diğer memeliler arasında yayılmasının engellendiği belirtilmektedir (34). Etken daha az olarak, koyun, kedi, köpek gibi hayvanlarda da görülmüş fakat bu hayvanlar ile insanlar arasında herhangi bir bulaş bildirilmemiştir. Ancak yapılan bir araştırmada, virüsün göçmen kaz sürüleri arasında vektör aracılı olmadan bulaşabildiği tespit edilmiştir (35). BNV, enfekte kuşu ısırması ile sivrisineğe girmekte, midesine tutunduktan sonra dokularında replike olmaktadır ve sitopatik etki yapmadan sineğin yaşamı boyunca persiste kalmaktadır (Şekil2-7). Virüsün, kış mevsimi boyunca, yıllık yeni enfeksiyon siklusunun başlangıcına kadar hayatta kalması gerekmektedir. Sivrisinekler yumurtalarını kirli ve durgun su kenarlarına bırakmaktadır ve yine bu alanlarda yaşayan yabani kuşların kanı ile beslenmektedir. Bu sinekler yaşam alanlarına yakın bölgelerde yaşayan memeli canlılara sabahın erken saatlerinde ya da akşam vakitlerinde saldırarak kan emme sırasında tükürüklerinde bulunan virüsü bulaştırırlar (2,1).



Şekil 2-7: Batı Nil Virüsü Bulaş Döngüsü (16)

Bir sivrisinek türünün, BNV'nin vektörü olarak göz önüne alınabilmesi için olması gereken kriterlerden bazıları;

- 1- İn vitro koşullarda sivrisinek tarafından beslenmek için alınan enfekte kanın, sivrisinek tarafından bulaştırılması ve BNV'nin etkili bir şekilde enfekte etmesi,
- 2- Sahadaki sivrisinek türlerinin yoğunluğunun yeterli düzeyde olması,
- 3- Sahadaki sivrisinek türlerinden BNV'nin izolasyon sıklığı (36).

Culex türü sivrisinekler, BNV'nin majör çoğaltıcı vektörü olmasına rağmen en az 11 cinse ait sivrisinek türünden izole edilmiştir. Bunlar: *Aedes*, *Aedemomyia*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Orthopodomyia*, *Psorophora* ve *Uranoteania*'dır. Virüsün Avrupa ve Afrika'daki yaygın vektörleri; *Culex pipiens*, *Culex univittatus* ve *Culex antennatus*'dur. Asya'daki majör vektörler; *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* ve *Culex pseudovishnui*. Avustralya'da başlıca vektör *Culex annulirostris*, Kuzey Amerika'da ise *Culex pipiens* ve *Culex restuans* kuzeyde, Batı Amerika'da *Culex tarsalis*, Güney Amerika'da ise *Culex quinquefasciatus* ise majör vektörlerdir (9). BNV bulaş döngüsünde sivrisineklerin yanı sıra, kenelerinde rolü olabileceğine dair çalışmalar yapılmış olup virüs, *Argasidae* (yumuşak) ve *Ixodidae* (sert) kenelerden izole edilmiştir (34).

Kanatlılar, yüksek düzeyde viremi oluşturdıklarından BNV için en önemli rezervuardır. Kuşlar, özellikle göçmen kuşlar virüsün doğal rezervuarıdır, bu sebeple virüsün herhangi bir bölgeye ilk kez veya tekrarlayan defalarda girişinde önemli rol oynamaktadırlar. Saha ve laboratuvar çalışmaları ile birçok kanatlı türünün BNV enfeksiyonuna duyarlı olduğu gösterilmiştir. Virüs kanatlılara enfekte sivrisineklerin ısırması ile bulaşır ve kanatlılarda uzun süreli olan yüksek viremi oluşturur. Göçmen olmayan yerli viremik kuşlar virüs yayılımına katkıda bulunuyor olsa da viremik göçmen kuşların BNV nin uzun mesafelere yayılımında en etkin ajan oldukları yaygın olarak kabul edilen görüştür. Aynı zamanda göçmen kuşların davranışları salgınların zamanlaması ve şiddeti yönünden kritik bir determinanttır. Kanatlılar arasında yaygın olarak göz önünde bulundurulmuş başlıca rezervuar *Passeriformes* türleri olmasına rağmen birçok takıma ait (*Charadriiformes*, *Falconiformes*, *Strigiformes*) tür virüsün rezervuarı olarak tanımlanmıştır. *Anseriformes* (ördekler), *Columbiformes* (güvercinler) ve *Piciformes* (ağaçkakanlar) türlerinde ise sivrisinek türlerini enfekte edebilecek yeterli viremi düzeyi oluşmamaktadır (9,34).

Primer BNV bulaş döngüsünde özellikle rol oynayan tür ev serçesidir. Hem Avrupa'da hem de Kuzey Amerika'da geniş popülasyona sahiptir. Bu bölgelerde yoğun olarak bulunması, sahadan toplanan türlerin BNV yönünden sıklıkla seropozitif olması ve laboratuvar çalışmalarında uzun süreli-yüksek viremi göstermesi bakımından majör rezervuar olarak göz önünde tutulmaktadır (34).

2.6. Batı Nil Virüsü Epidemiyolojisi

BNV, ilk kez tespit edildiği 1937'den beri Afrika kıtası boyunca, Orta Doğu'da, Kıta Avrupası'nda, Rusya, Hindistan, Endonezya, Avustralya ve 1999'dan beri Amerika'nın kuzeyi ve Orta Atlantik bölgelerinde bulunmaktadır. Enfeksiyonun yüksek derecede endemik görüldüğü alanlarda, BNV kaynaklı enfeksiyonlar genellikle ya dikkatten kaçmaktadır yada sınırlı sayıda salgınlar şeklinde görülmektedir (37).

BNV vakaları Akdeniz ülkelerinden Fas, Tunus, Cezayir, Mısır ve İsrail'de endemik olarak görülürken, 1990'lı yıllardan beri gelişen vakalarla dünyanın doğu yarım küresindeki Rusya, Çek Cumhuriyeti, Macaristan, Romanya, Fransa, Portekiz, İspanya, İtalya, Makedonya ve Yunanistan gibi birçok ülkede belirlenmiştir. BNV Amerika'da ilk kez 1999'da 62 vakadan 7'sinin ölümüne yol açan bir salgında görüldükten sonra hızla kıtanın batı ve güney eyaletlerine yayılmıştır. Kanada'da, ABD

ile benzer şekilde 1999'da 1 kişinin ölümü ile ortaya çıkan BNV enfeksiyonu, 2002-2009 yılları arasında 3573 vakaya ulaşmıştır ve bu salgınlarda çoğunluğu ensefalit ile karakterize 43 hasta hayatını kaybetmiştir. ABD ve Kanada gibi dünyanın batı yarım küresindeki ülkelerde gelişen bu salgınlar, Meksika, Arjantin, Kolombiya, Karayip Adaları ve Venezuela gibi ülkeleri de kapsayarak genişlemiştir. Böylece 21. yüzyılda BNV enfeksiyonları; sivrisineklerin uygun yaşam alanları ile yabani kuşların göç yollarının üzerinde bulunduğu, dünyanın birçok ülkesinde geniş bir coğrafyaya yayılmıştır (38).

Avrupa ve Akdeniz havzası gibi endemik bölgelerde BNV enfeksiyonlarının artmasıyla birlikte insan ve at populasyonlarını etkileyen geniş salgınlar bildirilmektedir. İnsan ve at populasyonlarındaki görülme sıklığının artmasıyla birlikte bu bölgelerdeki BNV ekolojisi daha iyi anlaşılmaktadır. 1990'lı yıllardan itibaren bildirilen salgınlara bakıldığında çoğunlukla Akdeniz havzasından; Arnavutluk (1994), Fas (1996), Tunus (1997-2003), Romanya (1996-2000), İsrail (1999-2000), Rusya (1999-2001) ve Fransa (2003)'dan bildirilmiştir. At populasyonlarını etkileyen salgınlar ise Fas (1996-2003), İtalya (1998), İsrail (2000) ve Güney Fransa (2000-2003)'dan bildirilmiştir (9).

Göçmen kuşların BNV'nin Akdeniz Havzası ve Avrupa'ya girişiyle ilişkili olduklarına dair birçok çalışma (İsrail, Polonya, Romanya ve Çek Cumhuriyeti) bildirilmiştir. Portekiz'de yapılan çalışmalarda 1971-2004 yılları arasındaki BNV izolatlarının genom uzunluklarının karşılaştırılması ve filogenetik analizlere dayandırılarak virüsün bölgeye tekrarlanan girişlerinin olduğu gösterilmiştir (39). Bu hipoteze göre göçmen kuşlar Afrika'da kışı geçirdikleri yerlerde virüs ile enfekte olduktan sonra Avrupa'ya göçleri ile birlikte virüsü Afrika yönünden kuzeye doğru taşırlar. Böylece bu hipotez ile salgınların niçin kuş göç yolları üzerindeki, göçmen kuş populasyonu, vektör ve rezervuar gibi eş zamanlı bulunması gereken faktörleri barındıran sulak alanların bulunduğu bölgelerde ya da yakın çevrelerindeki kentsel alanlarda olduğu açıklanmaktadır (35, 40) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: BNV salgınları ve kuşların ana göç yolları (105)

2.6.1. Türkiye’de BNV Epidemiyolojisi

Ülkemizde insan arbovirüs enfeksiyonlarına ilişkin ilk çalışma, 1964 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsünden Heperkan ve Arı ile John Hopkins Üniversitesinin ortaklaşa olarak yaptığı çalışmadır. İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır illerinde alınan toplam 559 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle antikor araştırılmış ve sonuçta Batı Nil virüsü veya buna yakın bir virüsle meydana gelen bir hastalığın ülkemizde de olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca yaşın ilerlemesiyle seropozitifliğin arttığı ve olguların tanımlamasının yapılabilmesi için bildirim zorunlu hastalıklar arasına alınmasının uygun olacağı da vurgulanmıştır (41). Daha sonra 1966 yılında Serter tarafından İzmir ve civarından Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları kliniğine menengial bulgularla getirilen hastaların 1/3’ünün viral olduğu ve bunların çoğunluğunun da Arboviruslar tarafından oluşturulduğu klinik ve laboratuvar kanıtlarıyla bildirmiştir (42).

Hayvan kaynaklı bir çalışmada Viyana üniversitesinden Radda tarafından Orta ve Doğu Anadolu illerinden alınan 214 evcil hayvana ait serum örnekleri ile yapılmıştır.

Ankara ve çevresinde BNV veya ona yakın bir etkenin aktif olduğu, Hatay çevresinde de muhtemelen BNV'nin aktif olduğu bildirilmiştir (43). 1970'li yıllarda Güneydoğu Anadolu bölgesinde 937 kişinin serum örneklerinde BNV seropozitifliğini hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle çalışılmış ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki değişik illerde %38 ile %47,8 arasında değişen oldukça yüksek oranlarda seropozitiflik bulunmuştur ve ayrıca seropozitifliğin yaşla birlikte arttığını vurgulanmıştır. Ancak bu ve benzeri çalışmalarda elde edilen sonuçların, Flavivirüsler arasında izlenen ve hemaglutinasyon inhibisyon yöntemi gibi gruba özgül testlerde ortaya çıkan antijenik çapraz reaksiyonlara bağlı olması kuvvetle muhtemeldir (44).

Yine 1971 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü ile Ege Üniversitesinin Orta ve Batı Anadolu illerinde yürüttükleri koyun ve insanları kapsayan çalışmada da İzmir, İstanbul, Ankara ve Konya'da BNV seropozitiflikleri saptanmıştır (45). Serter tarafından 1980 yılında yapılan Ege bölgesi kaynaklı bir başka çalışmada yine hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle 1074 kişinin %29,1'inde BNV antikorları saptanmış, bunun %74'lük bir bölümü de nötralizasyon testiyle doğrulanmıştır(46).

Özkul ve arkadaşları 2006 yılında Türkiye'nin 10 farklı ilinden (Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa, Bursa ve Ankara) çeşitli hayvanlar ve insanları kapsayan bir sero-epidemiolojik çalışma gerçekleştirmişlerdir. Toplanan serumlarda BNV'ye karşı gelişen nötralizan antikorların varlığını araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda BNV seropozitiflikleri hayvanlarda %1-37,7, insanlarda ise %20,4 olarak bildirilmiştir (47).

Güneydoğu Anadolu bölgesinde Şanlıurfa ve Siverek'de 2007 yılında yapılan bir başka çalışmada, 181 sağlıklı kişiden alınan serum örnekleri indirekt immunfloresan yöntemi ile BNV'ye karşı oluşan IgG sınıfı antikorlar yönünden araştırılmıştır. Çalışma sonucunda seropozitiflik %16 olarak bulunmuş ve bu seropozitifliklerin %9,5'i plak redüksiyon nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır. Bu çalışma sonucunda ülkemizde vektör aktivitesi ile doğru orantılı olarak insanlarda olası BNV enfeksiyonlarının varlığı gösterilmiştir (48). Orta ve Kuzey Anadolu'da 2516 kan donöründe yapılan bir diğer çalışmada, BNV'ye karşı oluşan IgG sınıfı antikorlar ELISA tekniği ile araştırılmıştır. Çalışmada %0,99 (25/2516) oranında IgG pozitifliği saptanmış olup, Ankara, Konya, Yozgat ve Sivas bölgelerinde yaşayanlara ait örneklerin %0,56 (14/2516)'sı plak redüksiyon nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır. Dört donöre ait olan örnekler ise BNV IgM yönünden reaktif olarak saptanmış fakat viral RNA saptanamamıştır. Bu çalışma

ile Orta Anadolu'da BNV'nin viral aktivitesinin varlığı gösterilmiştir (49). Bir başka çalışmada etiyojisi bilinmeyen aseptik menenjit/ensefalit olgularından alınan 87 serum ve BOS örneklerinde yapılan çalışmada, ELISA ve IFA yöntemleri ile BNV'ye karşı IgG ve IgM sınıfı antikorların varlığı araştırılmıştır. BNV pozitif bulunan örnekler real time PCR tekniği ile de tekrar değerlendirilmiştir. BNV-IgM antikorlar pozitifliği hastaların %9,2'sinde, IgG antikor pozitifliği ise %3,4'sinde tespit edilmiştir. Antikor pozitifliği gözlenen bütün serum örnekleri ve bunlara ait BOS örnekleri real time-PCR ile viral RNA yönünden negatif bulunmuşlardır. Ancak antikor pozitifliği saptanan bazı örneklerde Dengue ve Sandfly fever virüsüne karşı antikor tespit edildiği için Türkiye'deki flavivirusların ve bunların vektörlerinin epidemiyolojik özelliklerinin ortaya konulmasına ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (50).

2010 -2011 yılları arasında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'ne Türkiye'nin 15 farklı ilinden (Ankara, Adana, Antalya, Kocaeli, Afyon, Konya, Manisa, Sakarya, İzmir, Muğla, Isparta, Balıkesir, Diyarbakır, Aydın, Karaman) gelen şüpheli olguların örneklerinin incelenmesiyle 47 olguya BNV enfeksiyonu tanısı konmuştur. 47 olgudan 40'ında nöroinvaziv belirtiler görülmüştür. Avrupa Birliği vaka tanımına göre bu vakalardan 12'si kesin, diğerleri olası vaka olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışma ile Türkiye'de ilk kez insanlarda akut BNV enfeksiyonu olguları saptanmış ve uluslararası bildiri yapılarak belgelenmiştir. Vakaların ağırlıklı olarak Batı illerinden bildirilmesi de BNV'nin Türkiye'nin batısında endemik hale geldiğine işaret etmektedir (11).

2011 yılında olguların saptanması devam etmiş, Ankara ve Eskişehir kaynaklı eş zamanlı olarak at ve insan olguları saptanmış ve yapılan kısmi genom analizlerinde, ülkemizde dolaşımda bulunan virüsün "Lineage 1" izolatlarına benzerliği ortaya konulmuştur (51). Vakaların sivrisinek popülasyonunun çoğaldığı yaz mevsiminde ortaya çıkması ve çoğunlukla kuş göç yolları üzerinde bulunan illerde ağırlıklı olarak görülmesi, ülkemizde BNV enfeksiyonunun düşükte olsa aktivite gösterdiğine işaret etmekle beraber enfeksiyonların virüsün biyolojik döngüsü ile uyumlu olduğunu göstermektedir (52).

2.6.2. Bulaş Yolları

Batı Nil virüsünün omurgalılarına bulaşmasında primer yol öncelikli olarak artropod vektörler yolu ile dir. Birçok bölgede yaygın olarak bulunan *Culex pipiens* cinsi sivrisinekler virus bulaşında en etkili tür olarak gösterilmektedir. Virüsün omurgalılarına

öncelikli bulaşının artropod vektörler yoluyla olmasına rağmen artropod kaynaklı olmayan bulaş yolları da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. 2002 yılında ABD’de görülen epidemi sırasında yapılan çalışmalarda virüsün artropod vektörler dışında, organ transplantasyonu, kan transfüzyonu, emzirme, intrauterin bulaş ve iğne batması şeklinde çeşitli yollarla da bulaştığı bildirilmiştir (9).

Ağustos 2002’de ABD’de ilk kez intrauterin bulaş rapor edilmiştir. Gebeliğinin 27. haftasında meningoensefalit belirtileri göstermesi sonucu yapılan testlerde BNV IgM yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Doğum sonrası yapılan taramada yenidoğanda serolojik olarak BNV enfeksiyonu gösterilmiş, bilateral koryoretinit ve serebral dokuda kistik hasar olduğu tespit edilmiştir (53).

Anne sütü ile bulaş yine 2002 yılında ABD’de görülen epidemide bildirilmiştir. Kan transfüzyonu yapılan bir gebe hastada meningoensefalit gelişmesi sonucunda BOS örneği BNV yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Doğumdan sonra anne sütünde nükleik asit varlığı hem de bebeğini emzirmesi sebebiyle yenidoğanda IgM pozitifliği görülmüştür (53).

Kan transfüzyonu ile bulaş yine 2002 yılında ABD’de oluşan epidemi sırasında birçok enfeksiyonun transfüzyonla ilişkili olmasıyla görülmüştür. Bu yıl içerisinde (CDC)’ye bildirilen 61 vakadan 23’ünde, viremili donörden kan ürünü nakli sonrası alıcıda BNV enfeksiyonunun gözlenmesi ile transfüzyonla bulaşın olabileceği doğrulanmıştır. 23 alıcının 13’ünde BNV ile ilişkili meningoensefalit, 2’sinde Batı Nil ateşi gözlenmiştir (54,55)

Transfüzyon ile bulaş kan ürünlerinin (eritrosit, trombosit veya plazma) nakli sonrasında olmaktadır. Düşük düzeyli ve kısa süreli vireminin görüldüğü asemptomatik enfeksiyonlarda BNV seropozitifliğinin araştırılması bulaşı önlemede yetersiz kalmaktadır. Bu veriler ışığında Food and Drug Administration (FDA) kuruluşu 2003 yılında kanların kan donörleri açısından taranmasını istemiştir. Ancak enfeksiyona ait semptomlar hastaların ancak %20’sinde ortaya çıktığı için bu çalışmalar etkisiz olmuş, daha sonra tarama için nükleik asit testlerinin (NAT) kullanılması gerektiğini vurgulamıştır. FDA onayı alan NAT, asemptomatik viremik donörlerin saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır. 2003 yılında Amerika ve Kanada’da kan donörlerinde nükleik asit amplifikasyon testleri ile tarama başlatılmıştır. 2003 ve 2004 yılları arasında kan donörleri arasında yapılan taramalarda >1000 potansiyel BNV viremik kan donörü tespit edilmiştir. Bununla birlikte 2003 yılında transfüzyon kaynaklı 6 BNV

vakası, 2004 yılında 1 BNV vakasının enfektif kan komponentlerinin düşük konsantrasyonlu olması ile tarama testlerinden kaçtığı bildirilmiştir (55).

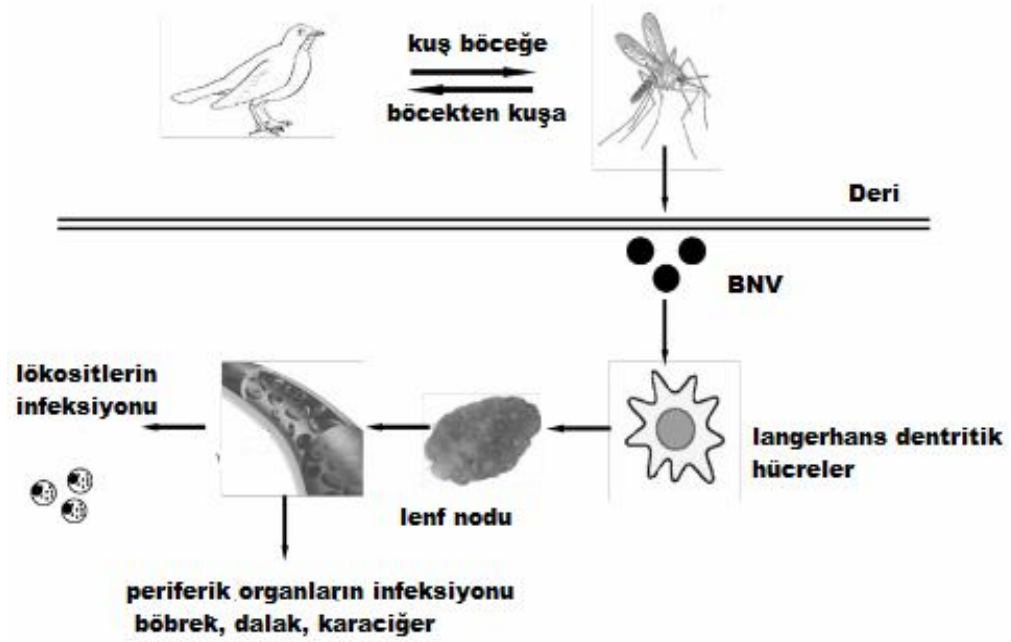
Ağustos 2002'de organ transplantasyonu ile bulaşın olduğu ilk olgular ortak bir donörden organ nakli yapılan 4 kişide görülmüştür. Alıcıların hepsinde ateş, 3'ünde meningoensefalit kliniği gelişmiştir. Dört alıcıda da BNV enfeksiyon tanısı konulmuştur. Organ donöründen alınan serum ve plazma örneklerinde PCR yöntemi ile BNV tespit edilmiştir (56). Kronik immünsüprese organ transplant hastalarında BNV hastalığı yönünden risk ciddi oranda artmaktadır. 2002 yılında Toronto ve Kanada' da solid organ alıcısı transplant hastalarında tahmin edilen nöroinvaziv BNV hastalığı riskinin genel popülasyona oranla 40 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (57). 2002 yılında ayrıca, mesleki maruziyet sonucu edinilmiş iki BNV enfeksiyonu da rapor edilmiştir. İki laboratuvar çalışanı BNV sürveyansı için hayvan otopsi yaparken perkütanöz el yaralanması sonucunda enfekte olmuş, her iki olguda da gelişen enfeksiyon hafif seyretmiş ve kendiliğinden tamamen iyileşmiştir (58).

2.7. Patogenez

BNV'nin yayılımı ve patogenezi ile ilgili edinilen bilgilerin çoğunluğu rodent modeller üzerinde yapılan çalışmalarla sağlanmaktadır. Enfekte sivrisineğin ısırmasından sonra BNV ile enfekte keratinositler ve Langerhans hücreleri lenf nodlarına göç eder ve böylece primer viremi başlar. Sonrasında virüs ilk replikasyon safhasının ortaya çıktığı, sırasıyla enfekte lenf düğümleri, makrofajlar, B hücreleri, folikuler dendritik hücrelerde replike olur. Dendritik hücreler bölgesel lenf düğümlerini enfekte ederken interferon Tip-1 ve Tip-2 salgılayarak kontagiyöz yayılmayı sınırlandırır. Daha sonra infeksiyöz virus afferent kanallara çıkar ve torasik kanal aracılığıyla dolaşıma katılır. Viremi sırasında birçok ektranöral doku hematojen yolla virus tarafından enfekte edilir ve bu dokulardan virüsün salınımı viremiyi devam ettirir epitel hücreleri ve makrofajlar, sonrasında böbrek ve dalak gibi periferik iç organlara yayılır (Şekil 2-8). Viremi düzeyine bağlı olarak virüs kan-beyin bariyerini geçer ve MSS'ne girer. BNV'nin MSS'ne girişi ile ilgili olarak öne sürülen çeşitli görüşler mevcuttur. Virüsün beyine girişi, vireminin en yüksek olduğu dönemde gerçekleştiğinden, MSS'ne yayılımın hematojen yol ile olduğu düşünülmüş, ancak daha sonraki çalışmalar kan-beyin bariyerini aşmada ek olarak bazı çözünür inflamatuvar faktörlerin de rol oynadığı gösterilmiştir. Endotelial hücre geçirgenliğinde TNF- α

aracılı değişkenliklerin virüsün hem MSS'ne girişini hem de olfaktör nöronlar ile olfaktör loba yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bir diğer mevcut görüş ise virüsün MSS'ne doğrudan rejenere olmuş aksonlar aracılığı ile periferal nöronlardan taşınması yolu ile ya da immün sistem hücreleri aracılığı ile virüsün MSS'ne kaçak yollarla girişi ile olduğu öne sürülmektedir (59, 60, 8). BNV enfeksiyon gelişimi hem konak faktörlerine hem de virüs suşuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Patojenitenin doğal immün yanıt ile ilişkisinin IFN- α/β yanıtının akut faz sırasında eksiklik göstermesiyle, ekstrasöral dokularda virüs replikasyonunun artması ve virüsün hızla beyine girmesi şeklinde olduğu belirtilmektedir. Virüs sinir sistemine ulaştığı dönemde hücrelerde fonksiyon bozukluğuna, erimeye, dokularda yangıya neden olmaktadır (61,62). Sonraki aşamada mononükleer hücreler enfeksiyon bölgesine göç ederler. Fakat bu safhada, ilerleyişin enfeksiyonun durdurulması yönünde mi yoksa efektif hücrelerin yıkımı ve sitokinlerin salınımı ile patogeneze katkı sağlanması yönünde mi olacağı açık olarak bilinmemektedir. Ölümcül BNV enfeksiyonunun patolojik bulguları "beyinde yaygın bir enflamasyon" ve "spinal kordonda küçük hemorajilerle yaygın bir nöronal dejenerasyon"dur. MSS'deki patolojik değişimler, nöronal ve glial hücrelerdeki viral çoğalma, enfekte hücrelere sitotoksik immün yanıt, yaygın perivasküler enflamasyon ve mikroglial nodül oluşumlarının doğrudan sonuçları ile olmaktadır (62,59). BNV insanlarda en sık beyin korteksi, talamus, beyin sapı, bazal ganglionlar, serebellum ve omurilik nöronlarında saptanmaktadır. Fakat enfeksiyonun olfaktör soğanı ve hipokampus'te de saptandığı olgular mevcuttur. Beynin birçok alanlarında ve omurilikte virüsün senkronize olarak görülmesi, MSS'ne giriş yolunun belirgin bir şekilde hematogen yayılma yoluyla olduğunu düşündürmektedir. Ölü insan olgularından alınan otopsi örneklerinde yapılan histolojik analizlerle elde edilen gliosis kanıtları, BNV enfeksiyonu sırasında mikroglial hücrelerin ve astrositlerin de katılımının olduğunu belirtmektedir (63).

Virüse karşı kazanılan immün yanıt BNV enfeksiyonlarının eradikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Virüsün E proteinine karşı gelişen nötralizan antikor yanıtı ile prM/M ve NS1 proteinlerine karşı oluşan antikorların da koruyucu olduğu gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda, subkütanöz enfeksiyondan dört gün sonra ortaya çıkan özgül IgM tipi nötralizan antikorların vireminin sınırlandırılması ve virüsün MSS'ne girişinin önlenmesinde ve hastalığın gidişinin belirlenmesinde önemli olduğu saptanmıştır (64,60).



Şekil 2-9: Virüsün deri içine girişi ve BNV enfeksiyonunun başlangıç patogenezi (103)

2.8. Batı Nil Virüsü Enfeksiyonunun Klinik Özellikleri

Dişi sivrisinek viremik vertebralı konaktan kan emerek enfeksiyon etkeni virüsleri alır. Etken virüs, sivrisinek konağın orta bağırsak epitelyum hücrelerini enfekte eder ve bazal lamina boyunca yayılarak sivrisineğin tükürük bezlerine yerleşir. Sivrisineğin ısırmasıyla birlikte tükürüğünde bulunan virüsler insanın kan dolaşımına girer. Plazmada serbest olarak dolaşan virüs duyarlı olan kapiller endotel, makrofaj, monosit ve retikuloendotelyal hücrelerine gider. Virüsün bu dokularda çoğalması ile ilk viremi tablosu gelişir (65,66). BNV enfeksiyonu insanlarda, subklinik enfeksiyondan ölüme kadar değişik klinik tablolara sebep olmaktadır. Nörolojik bulguların gelişmediği olgular Batı Nil ateşi olarak adlandırılırken meningoensefalit gibi nörolojik bulguların geliştiği olgular ise Batı Nil meningoensefaliti olarak adlandırılmaktadır. BNV ile enfekte hastaların yaklaşık %80'inde hastalık asemptomatik seyrederken hastaların %20'sinde BNV ateşi gelişmektedir. Doğal olarak oluşan enfeksiyonlarda inkübasyon periyodu 2-15 gün arasındadır ve grip benzeri hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır. Batı Nil virüsü enfeksiyonlarının semptomları baş ağrısı, ateş, sırt ağrısı, deride kızarıklıklar, lenfadenopati şeklinde görülmektedir. Daha şiddetli olgularda baş ağrısı ile birlikte görülen yüksek ateş, vücut kaslarında zayıflık, boyunu dik tutamama, uyuşukluk, zihinsel karışıklık, koma, kas titremeleri, konvülziyonlar ve sonuçta paraliz şeklindedir.

Baş ağrısı BNV enfeksiyonu için çoğu zaman önde gelen bir bulgu olabilir. BNV menenjit genellikle ateş, baş ağrısı ve ense sertliğine yol açar. Çocuklarda görülen Batı Nil ateşi olgularında makülopapüler döküntü görülmektedir. Ciddi enfeksiyonlar pankreatit ve hepatit ile de sonuçlanabilmektedir (66,67).

Hastaların yaklaşık %1'inde de menenjit, ensefalit ve akut gevşek paralizi ile seyreden nöroinvaziv hastalık gelişmektedir. Nöroinvaziv olguların %55-60'ının ensefalit ile sonuçlandığı, bunun da %20'sinin ölüm ile seyrettiği tahmin edilmektedir (67). Ensefalit riski yaşla birlikte artarken, transplantasyon hastalarında da diğer immüno-kompromise hastalardaki yüksek risk belirsiz olsa da, şiddetli seyreden habis BNV hastalığı geçiren kişilerde tanımlanmıştır (8).

2000 yılında özellikle ABD'de yukarıdaki semptomlarla seyreden 19 BNV enfeksiyonu olgusunun %90'ında ateş, %58'inde baş ağrısı, %21'inde boyunu dik tutamama, %58'inde mental değişikliği, %42'sinin kaslarında zayıflık, % 11'inde serebellar anomaliler saptanmıştır (67). Yine 2000 yılında İsrail'de saptanan 417 BNV olgusunda yüksek ateş (%98,3), baş ağrısı (%57,9), koma durumu (%16,7), gastro-intestinal semptomlar (%18,5), nörolojik semptomlar (%9,4) saptanmıştır. Hastalarda mortalite oranı (%14,1) ve ölen hastaların (%87,9)'unun 70 ve üzeri yaş grubunda olduğu belirlenmiştir (68). Nöroinvaziv rahatsızlık geçiren hastalardaki ölüm oranlarının genellikle %10 civarında olduğu belirtilmektedir. İleri yaş ölüm ile sonuçlanan BNV enfeksiyonları için en önemli risk faktörü olurken, 40 yaşından küçük olan hastalar arasındaki oran %0,8 iken 70 yaş ve üstü hastalar arasındaki ölüm oranı %17 olarak değişmektedir. Bilinç değişiklikleri ile görülen ensefalit, diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, hepatit C virüs enfeksiyonları ve immüno-supresyon ölümüne neden olan olası diğer risk faktörleridir (69,70).

2.9. Kan transfüzyonu açısından Batı Nil Virusunun Önemi

Kan transfüzyonu veya doku/organ transplantasyonu, birçok tıbbi uygulamada önemli bir tamamlayıcı tedavi yöntemi olmakla birlikte, bağışçılardan alıcılara patojenlerin taşınması açısından risk taşımaktadır. Son yıllarda kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile taşınan patojenlerden biri olarak gösterilen BNV'nün bu yol ile taşınabildiği ilk olarak ABD'de gösterilmiştir (71,9).

BNV enfeksiyonlu asemptomatik donörlerin transfüzyon kanlarında ve transplante edilecek dokularında sıklıkla çok düşük seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir.

Kısa süreli geçici viremi, BNV ile enfekte sivrisineğin ısırmasından sonra meydana gelmektedir ve inkübasyon periyodu yaklaşık 6 günde sonlanmaktadır. Hastada antikor yanıtının meydana gelmesi ile birlikte viremi ortadan kalkmaktadır. BNV antikorlarının yokluğunda, viremili asemptomatik donörler enfeksiyözdürler ve kan transfüzyonu veya organ transplantasyonu ile alıcılara virüsün taşınması açısından yüksek riske sahiptirler. Ayrıca 1°C-6°C arasında saklanan kan örneklerinde virüsün 42 güne kadar enfeksiyözitesini koruduğu belirtilmiştir (72,73). Kan transfüzyonu bulaşı ile ilgili detaylı bilgiler 2.6.2’de Bulaş Yolları başlığında verilmiştir.

2.10. Tanı

BNV enfeksiyonu ve birçok arbovirüs enfeksiyonu, hastalarda ensefalit nedeni olabilmektedir. Ya da nonspesifik viral sendromlar şeklinde görülmektedir. BNV benzeri klinik semptomlar gösteren, ensefalit, aseptik menenjit ve ateşli hastalık etkeni birçok patojen bulunmaktadır. Bu durum ayırıcı tanıda göz önünde tutulmalıdır. (CDC) BNV tanısında hastanın klinik özelliklerine ve hikayesine dayanılarak enfeksiyonun varlığından şüphenilebilir. Fakat tanı konulabilmesi için spesifik laboratuvar testlerinin sonuçları gereklidir (74).

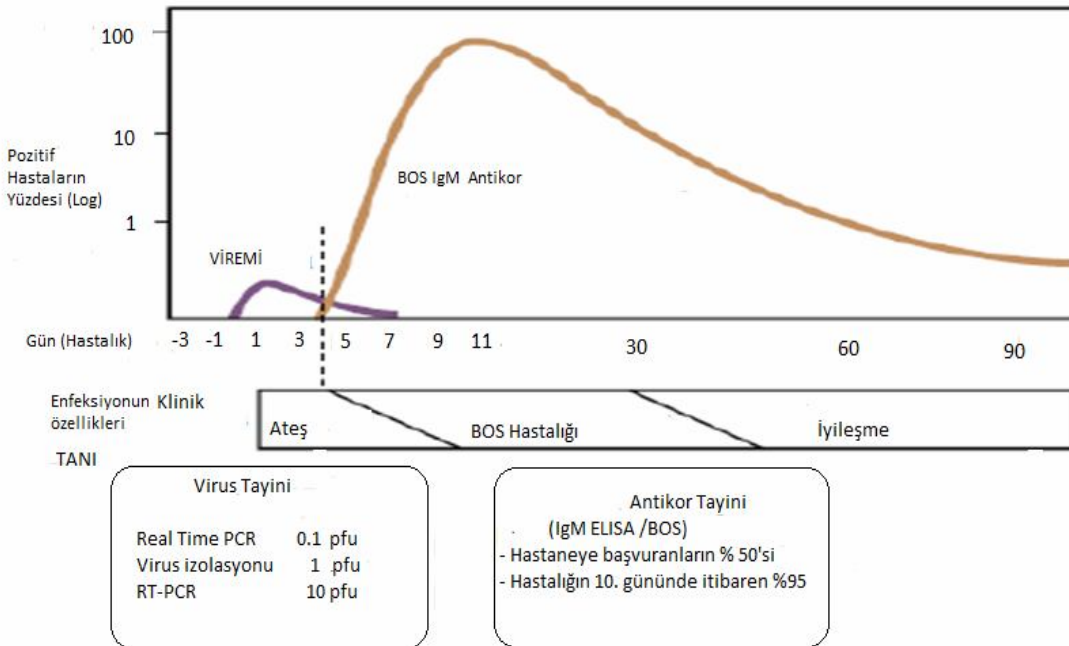
BNV enzootik aktivitesinin veya yerel insan vakalarının görüldüğü durumlarda hastalığın varlığına dair klinik şüphe daha da yükselmelidir. Yaz sonu veya sonbaharın erken dönemlerinde ya da sıcak iklime sahip yerlerde yılın herhangi bir döneminde ateş, baş ağrısı, kas güçsüzlüğü, eritematöz döküntüsü olan açıklanamayan ensefalit veya menenjit bulguları mevcut hastalarda BNV enfeksiyonu akılda tutulmalıdır (16,75).

BNV enfeksiyonlarının tanısında virüsün izolasyonu, viral antijen tayini ya da nükleik asidin saptanması ve virüse karşı oluşan özgül immün yanıtın gösterilmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Tanıda, virüs izolasyonu altın standart olmasına rağmen yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar haricinde, insanlarda ortaya çıkan viremi düşük düzeyde olduğundan genellikle virüs izolasyon çalışmalarında istenilen başarı elde edilememektedir (74, 8) (şekil 2-9).

Hastalık şüphesi olan kişilerde ve klinik belirtilerin görüldüğü dönemde, serum, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer vücut sıvılarında virüs teşhis edilebilmektedir. Serolojik tanıda, iki hafta ara ile alınan serum örneklerinde dört katlık titre artışı önemlidir. Sonucun pozitif bulunması akut enfeksiyonun bir göstergesidir. Ancak yinede yakın bir filavivirüs ile çapraz reaksiyon vermediğinden emin olunmalıdır. BNV,

genellikle JE kompleksi ile çapraz reaksiyon verebileceğinden yalancı pozitif sonuçlar görülebilmektedir. Bu nedenle, (plak redüksiyon nötralizasyon testi) PRNT testi ile gerekli doğrulamalar yapılmalıdır. Ayrıca hemaglutinasyon inhibisyon, kompleman birleşme reaksiyonu gibi testler, gruba özgül ve total antikorları saptamaları yönünden ve duyarlılıklarının daha düşük olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (76,77). Hastalığın 8-14 günlerinde alınan serumda veya hastalığın başlangıcından itibaren ilk sekiz gün içinde alınan beyin omurilik sıvısında IgM antibody-capture, enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) yöntemi ile BNV'ye karşı IgM yapısında antikorların saptanması en etkili tanı yöntemidir. Virüs, immün sisteminde sorun olmayan kişilerin kanından 10. güne kadar, immünsüpresif kişilerin kanında ise 28. güne kadar izole edilebilir (78). Viremi 4-8. günlerde pik yapmakla birlikte, düşük titrelerde (10^3 /mL) saptanabilmektedir. Uzun süre saklanacak örnekler -70 de muhafaza edilebilir. Fakat örneklerden sadece antikor bakılacaksa oda sıcaklığında 48 saat muhafaza edilebilir. Gaita, idrar ve boğaz sürüntü örneklerinden virüs izole edilememiştir (77).

Periferik kandaki total lökosit miktarı normaldir ya da kısmen yükselir. Nöroinvasif hastalık görülen hastaların BOS incelemelerinde glukoz düzeyleri normal, protein düzeyleri yükselmiş (genellikle <150 mg/dL) ve lenfositlerin artış gösterdiği orta-düzy pleositoz (genellikle <500 hücre/ μ L) görülür (75).



Şekil 2-10: Batı Nil virüs ensefalitinde viral ve serolojik göstergeler (107)

2.10.1. Virüs İzolasyonu

BNV izolasyonu için hem sivrisinek hem dememeli dokularından türetilmiş hücre hatlarının (Vero E6- RK-13- AP61- C6/36) kullanıldığı hücre kültürleri kullanılmaktadır. Doku, serum, plazma ve BOS örneklerinden ekimler yapılmakta ancak kolaylıkla izole edilememektedirler. Virüs izolasyonu virüsün tanısı için altın standart olarak kabul edilmektedir. Viremi seviyesinin yüksek seyrettiği vektörler ve kuşlar dışında, insanlarda ortaya çıkan viremi düşük düzeyde ya da sonlanmış olduğundan virus izolasyonu nadiren mümkündür. Buna karşın, beyin ve diğer solid dokular gibi otopsi materyallerinden virus izolasyonu yapılabilir (79,80).

Batı Nil virüsü ile ilgili araştırmalar, biyogüvenlik seviyesi 3. derece olan laboratuvar (BSL-3, Biosafety Level-3) koşullarında yapılmalıdır. Sitopatik etkinin görülmesi genellikle 7 güne kadar sürer. Hücre kültürlerinde sitopatik etkinin saptanması halinde, özgül monoklonal antikorların kullanıldığı IFA veya RT-PCR yöntemleri ile virus üremesinin doğrulanması yapılmalıdır (80,81).

2.10.2. Antijen Testleri

Tarama çalışmalarında kullanılmak üzere kanatlılarda ve sivrisineklerde viral antijenlerin saptanması amacıyla geliştirilen farklı yöntem ve duyarlılıklara sahip çeşitli ticari test sistemleridir (VecTest™, RAMP™). Enfekte sivrisineklerde BNV'nin niteliksel tayinini amaçlayan VecTest BNV antijen testi hızlı bir immuno kromatografik testtir. Antijen testleri nükleik asit testlerine oranla daha düşük duyarlılığa sahip olmalarına rağmen genellikle sürveyans çalışmalarında tercih edilmektedirler. Yapılan sivrisinek sürveyans çalışmalarında ciddi oranda BNV enfeksiyon oranlarına rastlanmaktadır (82,73).

2.10.3. Moleküler Testler

BNV genomu genellikle enfeksiyon sonrası periferik kanda 2-3 ile 14-18 günler arasında saptanabilir. Bu zaman aralığında serum ve/veya plazma örneğinde viral RNA'nın belirlenmesi mümkündür. Moleküler yöntemlerin analitik duyarlılığı yüksektir. BNV enfeksiyonunun tanısında tarama amacıyla sıklıkla kullanılan yöntem viral RNA'nın reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemiyle saptanmasıdır. Beyin ve diğer dokularda BNV'nin saptanmasında ve flavivirusların identifikasyonunda polimeraz zincir reaksiyonu testi yüksek duyarlılığa sahiptir.

Konvensiyonel RT-PCR'in duyarlılığı temel olarak BNV'nin hedef dizisine bağlıdır (10). Son yıllarda geliştirilen TaqMan deney sistemleri, klasik PCR yöntemlerine göre daha duyarlı sonuç vermekte ve daha iyi kantitasyon sağlamaktadır. TaqMan-RT-PCR tekniğinin klasik PCR tekniğine nazaran daha hassas olduğu yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (82). TaqMan prob temelli testler viral RNA teşhisinde oldukça hassas olmasına rağmen bazen virüse ait yeni varyantları bulmada yetersiz kalmaktadır. "SYBR Green" temelli testler TaqMan testleri kadar duyarlıdır ancak daha az özgüllüğe sahiptir. Özgüllüğün azalması her iki test için de dezavantaj olabilir. Çünkü çeşitli virüslerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Buna rağmen BNV varyantlarını daha iyi tanımladığı ve daha ekonomik olduğu belirtilmektedir (10).

Ayrıca virüsteki genetik çeşitliliğe bağlı olarak ya da primer/prob bağlanma dizilerinde mutasyon bulunan suşlarda, nükleik asit testlerinin etkinlikleri ve duyarlılıkları değişmektedir (83).

2.10.4. Serolojik Testler

İnsanlarda BNV enfeksiyonunun tanısında günümüzde "özel antikor tespitine dayalı yöntemler" yaygın olarak kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerin klinik önemini sınırlandıran, tüm flaviviruslar arasında görülen antijenik çapraz reaksiyonların varlığıdır. Oldukça özel zarf proteini (E) nötralizan antikor yanıtına dayalı yöntem sıklıkla daha az özel olan membran proteinine ve yapısal olmayan proteinlere karşı oluşan antikor yanıtına dayalı test ile birleştirilir. Bu test yaklaşımına dayanılarak serolojik yöntemler temel olarak iki ana alt gruba ayrılır. İlk grup; ELISA (enzim immünassay) ve IFA (immün floresan antikor)'ya dayalı yöntemleri kapsarken ikinci grup virüsün hücre kültürlerinde oluşturduğu sitopatik etkinin (CPE) gözlenmesi esasına dayalı PRNT (plak redüksiyon nötralizasyon testi), gruba özel ve total antikorların tespitine dayalı, duyarlılıkları daha düşük olan HI (hemaglutinasyon inhibisyon) ve CF (kompleman fiksasyon) testlerini kapsamaktadır (80,81).

ELISA ve IFA yöntemlerine dayanılarak geliştirilmiş farklı testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri de antijen kaynağı ve test platformuna bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple antijenik benzerliklerin görüldüğü flaviviruslara karşı geliştirilen ELISA, IFA veya HI gibi yöntemlere dayalı testler sonucunda saptanan antikor pozitifliği, en özel test olan plak redüksiyon nötralizasyon testi ile

doğrulanmalıdır (10,81,16). BNV enfeksiyonunda semptomların görülmesinin ardından, 8-21 gün sonrasında alınan BOS ve serum örneklerinde yapılan MAC ELISA (IgM-Antikor yakalama) testi virüsün teşhisi için en iyi tanı yöntemlerinden biridir. Bu yöntemin duyarlılığı %95'dir (76).

IgM antikorlarının serum veya BOS sıvısında MAC-ELISA yöntemi kullanılarak tespiti birçok klinik yöntem arasında BNV tanısı yönünden esastır. Çünkü IgM antikorları kan-beyin bariyerini geçemez, bu sebeple BOS sıvısındaki antikor varlığı MSS enfeksiyonuna işaret eder. Semptomların başlangıcından itibaren 8 gün içerisinde ensefalit ve menenjitli hastaların %90'ında IgM antikor varlığı kanıtlanabilir. Özgül BNV IgM antikorları başlangıçta serum ve plazmada tespit edilemez. Yapılan bir çalışmada Batı Nil ateşi klinik belirtileri gösteren hastaların yalnızca %58'inde MAC-ELISA ile sonuçlar pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte, akut ve konvelesan dönemde MAC-ELISA yöntemi ile serumda antikor varlığının gösterilmesi kesin tanı sağlamaktadır (84,75).

BNV varlığının serolojik testler ile doğru olarak yorumlanabilmesi için, enfeksiyonun epidemiyolojik açıdan ve kişinin önceden geçirdiği Flaviviral enfeksiyonlar, aşılama, endemik bölgelere seyahat öyküsü gibi çeşitli faktörler ile birlikte değerlendirilmeli; tanı klinik bulgular ve doğrulama testleri ile desteklenmelidir (76,8).

2.11. Tedavi

Batı Nil virüsü enfeksiyonunun insanlarda bilinen spesifik bir tedavisi ve aşısı yoktur. Bu sebeple enfeksiyonun semptomatik olarak görüldüğü hastalarda öncelikle destek tedavi uygulanmaktadır. Bu amaçla, baş ağrısı/kas ağrısı, ateş ve bulantı/kusma gibi enfeksiyon varlığına ait belirtileri gösteren hastalar için öncelikli olarak analjezik, antipiretik ve antiemetik ilaçlar kullanılabilir. Şiddetli olgularda sıklıkla hastaneye yatırmayı gerektiren destek tedavisi, şiddetli kusma durumunda rehidratasyon, şiddetli kas zayıflaması durumunda entübasyon ve mekanik ventilasyon ve sekonder enfeksiyon gelişmesinin önlenmesi temel olarak yapılması gereken uygulamalardır (75,81).

Batı Nil virüsü ensefaliti olan hastalar hastaneye yatırılmalı ve tedavi edilebilir santral sinir sistemi lezyonlarının ayırıcı tanısının yapılması ve ortadan kaldırılması gerekmektedir. Nöron dejenerasyonu ve ölümü sonucu gelişen serebral ödem BNV ensefalitinde sık görülen ölüm sebepleri arasındadır. Ensefaliti veya paralizi olan

hastalar, kafa içi basınç artışı olasılığına karşı gözlem altında tutulmalı, serebral ödem kontrol edilmeli, gerekirse tedavisi, konvülsiyonlar açısından takip ve duyu kaybı ile birlikte olan ve olmayan motor paralizi açısından değerlendirme yapılması şeklinde olmalıdır (50,8).

Analjezikler ve antipiretikler hastalığın ılımlı seyrettiği durumlarda yararlı olabilir. Steroid ve osmotik solüsyonlar bazı olgularda beyin ödemi azalttığı için beyin ödemi ve herniasyona karşı kısa süreli kullanımları önerilmektedir. BNV tedavisinde bilinen etkinliği kanıtlanmış bir antiviral yoktur. Bununla birlikte interferon alfa 2b, ribavirin ve pirazidin nükleozidleri gibi antiviral ajanların BNV'na karşı *in vitro* aktiviteleri gösterilmiştir. Fakat bu ajanların *in vitro* olarak potansiyel faydalarına karşın *in vivo* kullanımı ile ilgili destekleyici kontrollü klinik veriler bulunmamaktadır. Ribavirin bir guanozin analogudur ve doku kültürlerinde sitopatik etkiyi ve BNV replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (75,85).

Hem poliklonal antiserumlar hem de monoklonal antikorlar ile yapılan fare deneylerinde, BNV zarf glikoproteinine karşı, immun globulinlerin BNV ensefalitine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Kemirgen modeller ile yapılan çalışmalarda ise korumanın ilacın uygulama sıklığına, dozuna ve antikor tedavisinin zamanlamasına bağlı olduğu görülmüştür. Virüsün MSS'ne ulaşmasından önce antikorların verilmesi ile azami derecede önlemenin olduğu fakat virüsün MSS'ne girişinden sonra bile antikor verilmesinin düşük seviyede de olsa koruma sağladığı görülmüştür (85,86).

BNV'ye spesifik antikorları içeren yüksek doz intravenöz immünoglobulin (İVİG) uygulamasının fare ve kemirgenler üzerinde yapılan deneylerdeki etkinliğine dayanarak salgınlar sırasında insanlarda hiperimmün gamaglobulin uygulaması yapılması öngörülmüştür (86).

2.12. Korunma

BNV enfeksiyonundan korunma için öncelikli olarak enfekte sivrisineklere maruz kalma riskinin azaltılması gerekmektedir. Hem kişisel korunma yoluyla hem de toplum genelinde enfekte sivrisineklerin eradikasyonu ile gerekli önlemler alınmalıdır. Kişisel korunma kapsamında sivrisineklerin beslenme periyotları olan özellikle gün batımı ve şafak vakti zamanlarında sivrisinek kovucular kullanılması, cildin maruz kalan bölümlerini kapatan örtücü giysiler giyinilmesi, ev veya tesis çevresinde sivrisinekler için yaşam alanı teşkil edecek koşulların (su/yağmur birikintileri, yalaklar,

vb) yok edilmesi ve açık hava maruziyetinin azaltılması bulunmaktadır. Kişisel korunma önlemleri BNV epidemileri sırasında enfeksiyona maruz kalma riskini %50 oranında azaltmaktadır (85).

Toplum düzeyinde önlem alınabilmesi için hastalığın kontrolü amacıyla öncelikle bölgedeki ve çevredeki olguların izlenmesi, sivrisinek larva haritasının bilinmesi ve güncellenmesi, yetişkin sivrisinek kontrolü, atlardaki enfeksiyonun ve kuşlardaki ölümlerin izlenmesi ve bireysel risklerin azaltılması gerekmektedir. Alınacak önlemlerin uygulaması BNV aktivitesinin mevcut olduğu bölgelerin yerel yönetimleri tarafından uygulanmalıdır. Bunlar arasında da; vektörlerin larva ve erişkin formlarının kitlesel olarak yok edilmesini kapsayan ilaçlama çalışmaları (Entegre Sivrisinek Kontrol Programı), bulaş ve korunma konusunda halkın eğitimi ve kuşlar, diğer hayvanlar (özellikle atlar), sivrisinekler ve insanlarda sürveyans çalışmalarının programlanması yer almaktadır. Bireysel ve toplum bazında alınacak önlemlerin yanı sıra bir bölgede kuş ve at ölümlerinin sık gözlemlendiği durumlarda vakit kaybedilmeden ilgili sağlık kuruluşlarına haber verilmelidir (9,73,81).

Dış ortamlara dayanıklı olmayan BNV ısı, lipid çözücüler veya deterjan içeren dezenfektanlar içinde hızlı bir şekilde inaktive olur. Maruz kalacak deriye uygulanan DEET (N,N-dietil-m-toluamid) ya da permetrin içeren kremler nispeten toksik olmayan ve etkili sinek kovuculardır.

Çevrede sivrisinek barınma olasılığını en aza indirmek gerekmektedir. Culex türü sivrisineklerin yumurta dönemi, larva dönemi, pupa formu ve yetişkin dönemi olmak üzere toplam dört dönemleri vardır. Yetişkinler kış uykusuna yatar ve yaklaşık olarak Mayıs ayında ortaya çıkarlar. Sivrisinek popülasyonu Ağustos ayında en yüksek seviyeye ulaşır ve Eylül ayına kadar kan emmeye devam ederler. Dişiler yumurtalarını oluşturmak için besin olarak kana ihtiyaç duyarlar. Sivrisineklerin yumurta, larva ve pupa dönemleri durgun sularda oluşur, bu nedenle de sivrisinek ile mücadelede bu dönemi engellemek için durgun sular ve su birikintileri ortadan kaldırılmalıdır (76).

Ergin hale gelmeden sivrisineği kaynağında kontrol altına almak için 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 (34,73,81).

2.13. Aşı

Günümüzde insanlarda kullanılmak üzere geliştirilmiş ticari bir BNV aşısı henüz mevcut değildir. Amerika'da birçok aşı için faz I ve faz II klinik denemelerinin insanlarda kullanımı üzerine değerlendirmeleri yapılmıştır. İnsanlarda BNV aşısı üretilmemesindeki ana sebeplerden birinin ticari ilgi eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Veterinerlikte kullanılan lisanslı BNV aşıları mevcuttur. İnsanlarda kullanılmak üzere üzerinde çalışılan aşılar inaktive tüm virüs, rekombinant canlı virüs, alt ünite ve DNA aşılarıdır. Rekombinant aşılar da primer hedef prM ve E yapısal proteinlerini kodlayan genlerdir. Ayrıca yine prM/E alt ünitelerinden oluşan ve enfeksiyöz olmayan virüs benzeri partiküllerin (Virus Like Particles, VLP) kullanımı ile ilgili aşı çalışmaları da yapılmaktadır. Attenüe aşılar daha fazla antikor yanıtı oluşturmakta ve daha ekonomik olmaktadır ancak bu aşıların da immünsüprese kişilere uygulanması söz konusu değildir (80,82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kan Donörleri

Çalışmaya katılan donörler Marmara Bölgesi'ndeki 4 farklı kan merkezine gönüllü kan bağışında bulunmak üzere başvuran kan bağışçısı kişiler arasından seçilmiştir. Çalışma kapsamındaki kan merkezleri; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi (İstanbul), Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi (Edirne), Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi (Sakarya), Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi (Kocaeli) olarak belirlenmiştir. 4 farklı ildeki kan merkezlerine başvuran kan bağışçıları arasından -rastgele olmak koşuluyla- 2014 yılı Haziran-Eylül ayları arasında başvuran gönüllü donörler seçilmiştir. Kan bağışında bulunmak üzere çalışma kapsamındaki kan merkezlerine başvuran tüm adaylar, Kan Merkezi'nde uygulanan standart protokol gereği "Donör Formu" doldurmakta ve bu bilgilerin görevli sağlık personeli tarafından tek tek incelenmesiyle donör seçimi yapılmaktadır.

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın amaç ve içeriğini kapsayan ayrıntılı rapor hazırlanarak "Etik Kurul Başvuru Dosyası" halinde İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurulmuş 09.05.2014 tarih ve 604/02-12332 sayı etik kurul onayı alınmıştır.

3.1.2. Donörlerin Seçimi/Bilgilendirilmesi ve Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamındaki üniversitelerin bünyesinde bulunan Kan Merkezi'lerine başvuran donörlere, başvuru sırasında uygulanan Kan Merkezi'ne ait protokolün yanısıra etik kurallar gereği "Aydınlatılmış Onam Formu" okunarak bilgilendirilmeleri yapılmış ve formlar donörler tarafından imzalanmıştır. Ayrıca çalışmaya katılmayı kabul eden donörlere yaş, meslek, sürekli ikametgah yeri ve arboviral enfeksiyonlar açısından muhtemel risk faktörlerini belirlemek amacıyla dokuz sorudan oluşan "Kan Bağışçısı Bilgi Formu" donörler tarafından okunarak doldurulmuştur.

Marmara Bölgesi'nde yer alan İstanbul (CTF), Edirne (TRK), Sakarya (SAK), Kocaeli (KOC) illerinde ikamet eden ve çalışmaya katılan kan merkezlerine başvuran

sağlıklı kan donörlerinin sayısı her merkezden 60 gönüllü donör olmak üzere, toplamda 240 donör olacak şekilde belirlenmiştir. Örneklerin, herbir merkezde bir hafta içinde 5 örnek olmak üzere toplam 12 hafta (Haziran, Temmuz ve Ağustos, Eylül) boyunca alınması planlanmıştır.

3.2. Örneklerin Alınması İşlenmesi Ve Saklanması

Donörlerden alınacak kanların uygun koşullarda alınması ve saklanması amacıyla çalışma protokolü hazırlanmıştır. Merkezlerdeki yetkili personele verilen çalışma protokolünde, steril şartlarda ve hemolizsiz olarak 8-10 ml venöz kan, bir biyokimya tüpü ve bir hemogram tüpü olmak üzere iki tüp kan alınması belirtilmiştir. Plazma örnekleri PCR çalışması için çalışma yapıncaya kadar -70 °C'de muhafaza edilmiştir. Biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri ise 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış, serum örneklerinde BNV'ye karşı antikor varlığını tespit etmek için ELISA ve IFA çalışmaları yapıncaya kadar -70 °C'de saklanmıştır.

3.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virus (BNV) IgG ve IgM Antikorlarının Araştırılması

Kan donörlerinden alınan serum örneklerinde BNV'na karşı oluşan özgül IgG ve IgM tipi antikor varlığını tespit etmek amacıyla enzim temelli immünolojik bir yöntem (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) kullanılmıştır. Çalışma üretici firmanın belirttiği test prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. ELISA ile yapılan taramada pozitif bulunan örnekler floresan temelli bir test olan IIFT IgG/IgM (Indirect immunofluorescence test) uygulanmıştır.

3.3.1. ELISA Yöntemi ile BNV özgül IgG ve IgM Antikorlarının Araştırılması

Çalışmaya katılan merkezlerde gönüllü kan bağışçılarından toplanan serum örneklerinde BNV IgG ve IgM antikorlarının taranması amacıyla, standardize edilmiş ticari bir ELISA kiti (Anti-West Nile Virus IgG ELISA ve Anti-West Nile Virus IgM ELISA ; Euroimmun, Luebeck, Almanya) kullanılmıştır.

ELISA testi, serum yada plazmada BNV'ye karşı oluşan IgG sınıf antikorlar için in vitro olarak yarı kantitatif yada kantitatif, IgM sınıf antikorlar için ise yarı kantitatif bir değerlendirme yapılabilmesini sağlar. Testin prensibi; BNV antijenleri (BNV ile enfekte hücre lizati) ile kaplı mikropalak çukurlarına serum örneklerinin eklenmesi ve

özgül IgG veya IgM varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesi ikinci bir antikor sistemi (enzimle işaretli anti-insan IgG veya IgM konjugatı) kullanılarak saptanmasıdır. Yöntemin uygulanması sırasında, özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla, her inkübasyon basamağı sonrası yıkama işlemi uygulanmaktadır. Özgül bağlanmalar sonucu oluşan renk değişimini değerlendirmek amacıyla ise spektrofotometrik yöntem kullanılmaktadır.

Çalışmada BNV IgG ELISA ve IgM ELISA testi üretici firmanın test prosedürleri doğrultusunda 96 çukurlu mikroyuvalar kullanılarak çalışılmıştır:

1. Serum örnekleri kit içerisinde bulunan tampon solüsyonu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Sulandırma işleminde serum örneklerinden 10 µl alınarak 1.0 ml tampon solüsyon içerisine eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı.
2. IgM tipi antikor varlığını saptamak amacıyla çalışılacak olan dilüe örnekler vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. IgM için uygulanan bu prosedürde amaçlanan serum örneklerinde bulunabilecek romatoid faktör ile özgül IgG birleşiminin yol açacağı yanlış pozitif IgM sonuçlarını engellemektir.
3. Kit içerisinde bulunan kalibratörler, pozitif/ negatif kontroller ve dilüe edilen serum örnekleri sırasıyla mikroyuva kuyucuklara 100'er µl olacak şekilde pipetlendi. Kit içerisinde bulunan ve kantitatif değerlendirme yapılmasına olanak sağlayan kalibratörler farklı BNV antikor konsantrasyonlarına sahiptir.
4. IgG prosedürü için; Kalibratör 1 (200 RU/ml), Kalibratör 2 (20 RU/ml), Kalibratör 3 (2 RU/ml) şeklinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır. Testin kalite kontrolünün sağlanması için gerekli pozitif ve negatif kontroller de kit içerisinde kullanıma hazır halde yer almaktadır.
5. IgM prosedürü için Kalibratör 1, pozitif ve negatif kontroller de kit içerisinde kullanıma hazır halde yer almaktadır
6. Kuyucuklara pipetleme işleminin yapılmasının ardından test plağının üzeri bir slayt ile kapatılarak 60 dk. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

7. Kit içerisindeki 10x konsantrasyondaki yıkama solüsyonu 1 birim solüsyona 9 birim distile su ile sulandırılarak dilüe edildi.
8. İnkübasyon sonrası, kullanıma hazır hale getirilen yıkama solüsyonu ile mikropalak kuyucuklar 3'er kez yıkandı.
9. Yıkama işlemi sonrası herbir mikropalak kuyucuğa 100'er µl (peroksidaz enzimi ile işaretli anti-insan IgG ve peroksidaz enzimi ile işaretli anti-insan IgM) enzim konjugat solüsyonu pipetlendi. Kuyucukların üzeri slayt ile kapatılarak oda sıcaklığında (18 °C – 25 °C) 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonra mikropalak kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 3'er defa yıkandı.
11. Yıkama işlemi sonrası mikropalak kuyucuklara 100'er µl kromojen/substrat solüsyonu pipetlendi. Pipetleme işlemi sonrası kuyucuklar gün ışığından korunarak oda sıcaklığında (18 °C–25 °C) 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon süresinin bitiminde her bir kuyucuğa 100'er µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu.
13. Reaksiyonun sonlandırılmasını takiben 30 dk. içerisinde kuyucuklardaki renk değişimlerinin 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu aralığı 620 ve 650 nm) spektrofotometrik yöntem ile okutuldu.

3.3.2. ELISA IgG için Cut-off hesaplanması

Çalışmada kullanılan standartların (kalibratör 1, 2, 3) absorbans değerlerinden bilgisayar destekli elde edilen grafiğe dayanarak örneklerdeki antikor konsantrasyonları mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olarak kantitatif olarak saptandı. Örneklerdeki antikor konsantrasyonu <16 RU/ml ise negatif, ≥ 16 RU/ml ile < 22 RU/ml arası değer şüpheli pozitif (borderline), ≥ 22 RU/ml ise pozitif olarak kabul edildi. Üretici firma tarafından test prosedürlerinde testin duyarlılığı %99.5, testin özgüllüğü ise %96.9 olarak belirtilmiştir.

3.3.3. ELISA IgM için Cut-off hesaplanması

IgM sonuçlarının değerlendirilmesi standarda (Kalibratör 1) ait absorbans değeri (optik dansite, OD) kullanılarak kontrolün alt sınır değerinin, kalibratörün alt sınır değerine bölünmesiyle elde edilen oran hesaplaması ile yapıldı. Oran < 0.8 olduğunda negatif, oran $\geq 0.8 - < 1.1$ bulunan örnekler şüpheli pozitif (sınırdaki pozitif), oran ≥ 1.1 ise sonuç pozitif olarak kabul edildi.

3.4. Serum Örneklerinde Batı Nil Virus (BNV) IgG ve IgM Antikor Varlığının Doğrulanması

Batı Nil virus IgG antikorları ELISA yöntemi ile pozitif/şüpheli pozitif bulunan serum örneklerinin sonuçlarının doğrulanması; duyarlılık ve özgüllüğü ELISA yöntemine göre görece olarak daha yüksek olan, kalitatif ve kantitatif değerlendirme yapılmasına olanak sağlayan, indirekt immünofloresan antikor yöntemi ile yapılmıştır.

3.4.1. İndirekt İmmünofloresan Antikor (IIFT) Testi

BNV IgM ve BNV IgG yönünden pozitif, sınırdaki pozitif ve şüpheli olan serum örneklerine duyarlılığı ve özgüllüğü ELISA yöntemine göre yüksek olan ticari bir kit ile (Anti-West Nile Virus IgG/IgM IIFT; Euroimmun, Almanya) doğrulama yapılmıştır. Test prensibi lam üzerinde BNV ile enfekte hücrelerle kaplı özel alanlara serum örneklerinin damlatılmasıyla özgül IgG/IgM varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin, ikinci bir antikor sistemi (floresanlı madde ile işaretli anti-insan IgG/IgM konjugatı) ile saptanmasını esas almaktadır. Özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla inkübasyon basamaklarından sonra yıkama işlemi yer almaktadır. Özgül IgM/IgG varlığında oluşacak bağlanmalar sonucu parlak yeşil floresan oluşmaktadır ve floresan mikroskobu ile değerlendirilmektedir.

Çalışmada kullanılmak üzere 10 gözlü özel tablalar (Reagent tray) ve BNV ile enfekte hücrelerin kaplandığı 5 gözlü özel lamalar (Biochip slide) BNV IgM/IgG IIFT üreticisi firma tarafından temin edilmiştir. Testin uygulanışı üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1. IgG sınıf antikorların varlığını tespit için serum örnekleri kit içerisinde hazır olarak bulunan sample buffer ile 1:10 oranında dilüe edildi. 100 µl

sample buffer ile 11.1 µl serum örneği tüp içerisine konulduktan sonra 2 sn. vortekslendi.

2. IgM sınıf antikorların tespiti için dilüsyon işleminde EUROSORB kullanıldı. Sulandırma işleminde 100 µl EUROSORB ile 11.1 µl serum örneği tüp içerisine konulduktan sonra 4 sn. vortekslendi. Ve oda sıcaklığında 15 dk. İnkübasyona bırakıldı.
3. Tablalar üzerindeki her bir alana sırasıyla 30 µl; pozitif kontrol, negatif kontrol ve dilüe edilmiş donör serumları otomatik pipet yardımıyla damlatıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
4. Özel 5 gözlü lamalar, serum örneklerine tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi ve 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon basamağından sonra yapılacak yıkama işlemlerinde kullanılmak üzere PBS-T (Phosphate-buffered saline + Tween-20) solüsyonu hazırlandı. Kit içerisinde hazır olarak toz halinde bulunan PBS paketi 1 L distile su içerisinde çözüldü. ve üzerine kit içerisinde hazır olarak bulunan 2 ml Tween-20 eklenerek köpürmeyecek şekilde iyice karıştırıldı.
6. İnkübasyon süresi bitiminde lamalar, tablalar üzerinden kaldırıldı. Üzerlerinden PBS-T solüsyonu geçirildikten sonra içerisinde PBS-T solüsyonu bulunan küvetler içerisine yerleştirilerek 5 dk. bekletildi.
7. Temiz tablalar üzerine 25 µl konjugat solüsyonu (floresan işaretli anti-insan IgM/IgG) pipetlendi.
8. Küvet içerisinden çıkarılan lamalar kısa bir süre kurumaları için bekletildi. Kurutma işleminden sonra lamaların hücre kaplı yüzeyleri konjugat ile tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi. Gün ışığı ile temasını önlemek amacıyla tablaların üzeri kapatılarak 30 dk. inkübe edildi.
9. İnkübasyon işlemi sonrası lamalar tablalar üzerinde kaldırılarak yukarıda (madde 6) tarif edildiği şekilde yıkama işlemi tekrarlandı.
10. Kit içerisinde bulunan lameller üzerine her bir alana 10 µl (1 damla) kit içerisinde hazır olarak bulunan gliserol damlatıldı. Kuruyan lamalar

üzerlerine gliserol damlatılmış lameller üzerine kapatılarak lam ile lamelin iyice yapıştığından emin olundu.

11. İncelemeye hazır hale getirilen preparatlar floresan mikroskopunda (EUROStar II, Euroimmun, Almanya) 20x ve 40x büyütmede incelendi.
12. Özgül antijen-antikor birleşmesini floresan bağlı ikinci bir antikor sistemi ile saptamaya yönelik test prensibine göre; BNV ile enfekte hücrelerin sitoplazmasında yeşil renkli parlak floresans veren küçük granüler yapıların görülmesi ile değerlendirilme yapıldı. İncelenen örneklerde floresans şiddeti pozitif ve negatif kontroller ile karşılaştırılarak zayıf (+), orta (++) veya güçlü (+++) ve çok güçlü (++++) pozitif olarak yorumlandı.
13. Kit üreticisi firma tarafından IgG için testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %98, IgM testi için duyarlılık %94, özgüllük ise %100 olarak belirtilmektedir.

3.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testi ile Viral RNA Araştırılması

BNV viral RNA izolasyonunda temel amaç, nükleik asidin hedef serum örneğinden izole edilmesidir. Bu sebeple nükleik asidin tüm diğer hücre komponentlerinden ayrılıp saflaştırılması gerekir. Bu doğrultuda viral RNA izolasyonunun basamakları; hücre membran ve çeperinin parçalanması, nükleaz aktivitesinin inaktif hale getirilmesi, nükleik asidin uygun taşıyıcıya bağlanması, solüsyonun proteinlerinden arındırılması, nükleik asidin konsantre edilmesi ve izole edilen viral RNA'nın uygun olarak depolanması olarak sıralanır.

3.5.1. BNV Viral RNA Ekstraksiyon

Nükleik asit varlığının araştırılması amacıyla Real-Time PCR silica membran tabanlı kolon yöntemine dayalı Viral RNA ekstraksiyon kiti (Bosphore, Türkiye) kullanıldı. Viral RNA Ekstraksiyon Spin Kit (Bosphore), manuel viral RNA izolasyonu için tasarlanmıştır. Kit içerisinde izolasyon için gerekli solüsyonlar ve spin kolon için gerekli sarf malzemeler hazır olarak bulunmaktadır. Test prosedüründe örnek başlangıç hacmi 400 µl, geri alma (elution) hacmi ise 60 µl olarak belirtilmiştir. Amplifikasyon aşamasında eldeki plazma örnekleri kullanıldı. Çalışmada plazma örneklerinden beşerli havuz (pool) yapıldı. Bu amaçla her plazma örneğinden 80'er µl alınarak 400 µl'lik

havuzlar oluşturuldu. İzolasyon protokolünün uygulanışı üretici firmanın test prosedürlerinde belirttiği şekilde yapıldı:

1. Kit içerisinde hazır olarak verilen 1.1 ml PK Storage Buffer, Proteinaz K tüpüne eklendi ve vortex ile karıştırıldı. Carrier tüpüne 1.0 ml RNazdan arındırılmış dH₂O eklendi ve vortex ile karıştırıldı.
2. 400 µl pool örnek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 40 µl Proteinaz K, 20 µl Carrier ve 5 µl internal kontrol (IC) eklendi.
3. Hazırlanan karışım üzerine 400 µl kit içerisinde hazır olarak bulunan Buffer LB1 solüsyonu eklendi ve vortekslendi. 10 dk. 56 °C de 10 dk inkübasyona bırakıldı (Mixing Block-MB102, BIOER).
4. 10 dk. sonunda karışımın üzerine 500 µl Buffer IR2 solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. 5 dk. oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonrası karışımın 650 µl'si membrana aktarıldı ve 8.000 rpm' de 1 dk. santrifüj (Nüve/NF048-24'lü) edildi.
6. Santrifüj işlemiyle aşağıya geçen sıvı pipetle çekilerek tıbbi atığa atıldı ve spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu ve karışımın kalan kısmı tekrar kolona aktarılarak 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Santrifüj işlemiyle aşağıya geçen sıvı pipetle tıbbi atığa atıldı ve spin kolon tekrar toplama tüpünün içine konuldu.
8. Pipet ucunun membrana değmemesine dikkat edilerek 450 µl Buffer W3 solüsyonu eklenerek 1. yıkama işlemi için 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Aşağıya geçen sıvı pipetle çekilerek tıbbi atığa atıldı ve spin kolon toplama tüpünün içerisine konuldu. Pipet ucu membrana değdirilmeksizin, 2. yıkama aşaması için 450 µl Buffer W3 solüsyonu eklendi.
10. 8.000 de rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. aşağıya geçen sıvı pipetle çekilerek tıbbi atığa atıldı ve spin kolon toplama tüpünün içine konuldu ve kolon boş olarak 12.500 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi.
11. Alttaki toplama tüpü aşağıya geçen sıvıyla beraber tıbbi atığa atıldı.

12. Spin kolon temiz 1.5 ml.'lik mikrosantrifüj tüpüne konarak 1 dk. bekletildi ve pipet ucu kolona değdirilmeden tüplerin içerisine 60 µl EL4 solüsyonu eklendi. 12.500 rpm'de 1 dk. santrifüjlendi.
13. Kolon tüpler atılarak aşağıya toplanan sıvıda var olabilecek RNA örneğinin kantitasyon aşaması için tüplerin kapakları kapatıldı ve +4 °C de muhafaza edildi.

3.5.2. BNV Viral RNA Kantitasyon Testi

Batı Nil Virüsü genetik materyali, RNA'dan oluştuğu için Reverse Transkripsiyon PCR (RT-PCR) tekniği ile amplifiye edilir. Bu amaçla çalışmada RT-PCR esasına dayalı (Bosphore West Nile Virus Quantification Kit, Türkiye) ticari kit kullanıldı. Bu yöntemde patojenin genomik yapısı, oligonükleotit probalar üzerine yerleştirilmiş floresan boyalar aracılığıyla saptanır. RT-PCR için gerekli bileşenler (PCR Master Mix, RT Mix, İnternal Kontrol, Kantitasyon Standartları, Pozitif ve Negatif Kontroller) kit içeriğinde hazır olarak bulunmaktadır.

3.5.2.1. Reaksiyon Bileşenleri ve Karışımların Hazırlanması

Tüm kit bileşenleri kullanmadan önce oda ısısına getirilerek çözdürüldü. RNA izolasyonunu ve PCR inhibisyonunu kontrol etmek amacıyla, kit içerisinde insan genomundan elde edilmiş sentetik bir DNA molekülü olan İnternal Kontrol (IC) hazır olarak bulunmaktadır.

Internal Kontrol izolasyon aşamasında örnek başına 5 µl olarak eklendi. Kantitasyon standartları 5 adet olup farklı konsantrasyonlara sahiptir. 10000, 1000, 100, 10, 2 kopya/µl konsantrasyonlara sahip kantitasyon standartları sentetik plazmidlerden oluşmaktadır. (Şekil 3.1).

Pozitif kontrol sentetik plazmid içermekte olup reaksiyon verimini test etmek amacıyla PCR'a dahil edildi.

Negatif kontrol olarak kit içerisinde hazır olarak bulunan dH₂O kullanıldı. Hazırlanan master miks (PCR-Master Mix ve RT-Mix) hacmi reaksiyon sayısı kadar çoğaltarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve tüplere 15 µl olarak pipetlendi. 10 µl RNA (örnek, standartlar, pozitif/negatif kontroller) eklenip tüplerin kapakları sıkıca kapatıldı (Tablo 3-1).

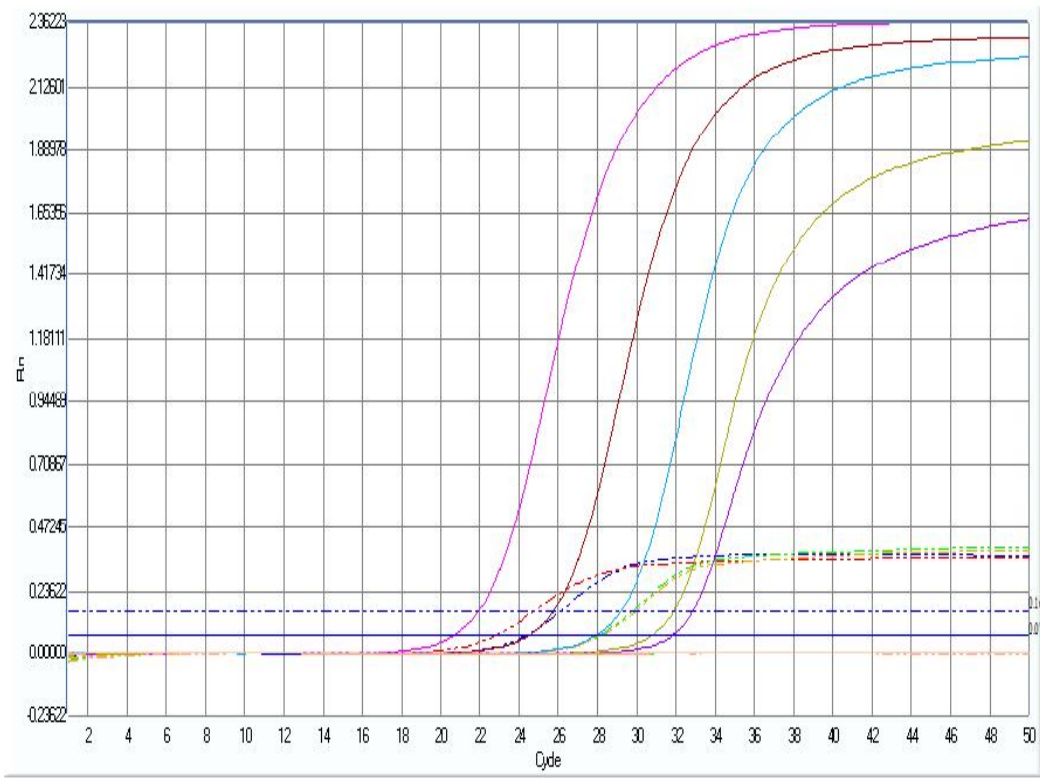
Tablo 3-1: Reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Bileşenler	Reaksiyon hacmi
PCR-Master Mix	14.75 µl
RT-Mix	0.25 µl
Örnek	10 µl
Toplam Hacim	25 µl

Kullanılan ticari kitin termal protokolü, ilk önce bir reverse transkripsiyon aşaması ve ikinci olarak da Real-Time PCR aşamasından oluşmaktadır. PCR-Master Mix bileşenlerinden HotStartTaq DNA polimeraz aktivasyonu için bir ilk denatürasyon, iki aşamalı amplifikasyon döngüleri ve son bir inkübasyondan oluşmaktadır. Real-Time PCR verileri, amplifikasyon döngüsünün ikinci aşamasında toplanmaktadır (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Termal protokol

Reverse Transkripsiyon	50 °C	30:00 dk.
İlk Denatürasyon	95 °C	14:30 dk.
Denatürasyon	97 °C	00:30 dk.
Bağlanma ve Sentez	55.5 °C	01:10 dk.
İnkübasyon	22 °C	05:00 dk.



Şekil 3-1: Real Time PCR cihazında 10000, 1000, 100, 10, 2 kopya/μl konsantrasyonlara sahip beş adet kantitasyon standartlarının görünümü.

3.5.2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

PCR işlemleri, Montania 483 (Anatolia Geneworks) marka Real Time PCR cihazında uygulandı. Sonuçlar çalışma sonunda cihazın software programına ait ekranında pozitif, negatif ve internal kontroller ile birlikte değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan Donörlerinin Demografik Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 226 sağlıklı kan donörlerinden 21'i kadın 205'i erkek olup donörlerin yaş aralığı 20-60 yıl (yaş ortalaması: 33,87) arasında değişiklik göstermektedir. Kadınların yaş ortalaması 33,04 yıl, erkeklerin yaş ortalaması ise 33,96 yıl olarak bulunmuştur. Donörlerin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Donörlerin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

Yaş Grubu (yıl)	Kadın (n)	Erkek (n)	Toplam (n)
20-40	6	168	174
40-60	15	37	52
Genel toplam	21	205	226

Çalışma kapsamına alınan merkezlerden toplanan örneklerin 84'ü İstanbul ilinden, 60 örnek Edirne ilinden, 58 örnek Kocaeli ilinden ve 24 örnek Sakarya ilinden toplanmıştır. Kan merkezlerine başvuran donörlerin 81'i (%35,9) İstanbul ili ve ilçelerinde, 33'ü (%14,6) Edirne ili ve ilçelerinde, 31'i (%13,7) Sakarya ili ve ilçelerinde, 46'sı (%20,3) Kocaeli ili ve ilçelerinde, 17'si (%7,5) Kırklareli ilinden, 18'i (%8) diğer illerde (Tekirdağ, Ankara, Balıkesir, Antalya, Yalova, Çanakkale, Kıbrıs, Gebze, Ardahan, Urfa) ikamet etmektedir.

Çalışmaya katılan donörlerin mesleklerine ve uğraşlarına göre dağılımı ise; 16'sı (%7) çiftçi, 56'sı (%25) memur, 114'ü (%51) serbest meslek sahibi, 18'i (%8) öğrenci, 5'i (%2) hayvancılık işiyle meşgul iken 17'si (%7) herhangi bir meslek grubuna dahil değildir.

Gönüllü donörler tarafından doldurulan anket sorgulamaları arboviral enfeksiyon risk faktörleri göz önünde tutularak hazırlanmış ve donörlere ait anket verileri bu faktörlere verilen cevaplar doğrultusunda değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde risk faktörlerinden açık alanda bulunma (n=121) %53, sivrisinek

maruziyeti (n=96) %42, kümes hayvanı/evcil hayvan/binek hayvanı bulundurma (n=60) %26, ölü kuşa rastlama öyküsü (n=16) %7, kene ısırma öyküsü (n=12) %5, çiğ süt ürünleri tüketimi (n=78) %34,5 ve son altı ay içinde yurtdışında bulunma/seyahat öyküsü (n=16) %7 olarak bulunmuştur.

4.2. Batı Nil Virüsü (BNV) ELISA IgM ve IgG Antikor Bulguları

ELISA yöntemi ile BNV antikor (IgM ve IgG) varlığı aranan örneklerin 2 (%0,9)'sinde özgül BNV IgM antikor pozitifliği ve 2 (%0,9) örnekte BNV IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. Örneklerin %97,7'si ELISA ile BNV IgM ve IgG antikorları varlığı yönünden negatif olarak bulunmuştur.

BNV ELISA IgM antikor pozitifliği saptanan iki örnekten biri Kocaeli diğeri Edirne İli kan merkezlerine ait örnekler olup, Kocaeli merkezli (Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi) donörün ikamet adresi Sakarya ili olarak saptanmıştır. Kocaeli merkezli BNV ELISA IgM antikor pozitifliği bulunan örneğin, çalışma başlangıcı itibariyle (15/06/2014) 4. haftanın 3. örneği (4H/3/KOC)'dir. Edirne merkezli (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi) BNV ELISA IgM pozitifliği saptanan örnek ise 7. Hafta toplanan örnekler arasında 2. güne ait (7H/2/TRK) örnektir.

BNV ELISA IgG antikor pozitifliği saptanan örnekler İstanbul ve Edirne illerindeki çalışma merkezlerine gönüllü kan bağışında bulunan donörlere aittir. İstanbul merkezli (İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi) alınan örnek çalışma başlangıcı itibariyle 8. hafta alınan 2. örnektir (8H/2/CTF). Edirne merkezli ELISA IgG pozitifliği saptanan serum örneği ise 9. haftada alınan 1. örnektir (9H/1/TRK).

ELISA IgM ve IgG antikor varlığı açısından pozitif bulunan örneklerin kantitatif değerleri ve demografik verileri Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: BNV ELISA IgM ve IgG pozitifliği saptanan örneklerin kantitatif değerleri ve demografik verileri.

Örnek No/Çalışma Merkezi	Cinsiyet/Yaş	İkamet Ettiği İl	Meslek	Risk Faktörleri	BNV ELISA IgM Kantitatif Değeri (Ratio)*	BNV ELISA IgG Kantitatif Değeri (RU/ml) **
4H/3/KOC	E/32	Sakarya	Serbest	Açık alanda bulunma	2,131	Negatif
7H/2/TRK	E/28	Edirne	Hayvancılık	Açık alanda bulunma, sivrisinek maruziyeti, çiğ süt tüketimi, binek hayvan bulundurma	2,786	Negatif
8H/2/CTF	E/22	İstanbul	Öğrenci	Açık alanda bulunma, sivrisinek maruziyeti	Negatif	111,3
9H/1/TRK	E/38	Edirne	Serbest	Açık alanda bulunma, sivrisinek maruziyeti, çiğ süt tüketimi	Negatif	129,9

E: Erkek; K: Kadın; KOC: Kocaeli; TRK: Trakya; CTF: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.

* IgG değeri RU/ml biriminde olup, pozitiflik için sınır değer ≥ 22 RU/ml'dir.

** IgM pozitiflik için sınır değer Ratio (Oran: Örnek/Cut off) ≥ 1.1 .

4.3. Batı Nil Virüsü (BNV) İndirekt İmmüno Floresan Antikor (IFA) Testi Bulguları

ELISA yöntemi ile yapılan taramada pozitif bulunan serum örnekleri ve ELISA taraması ile negatif bulunan, fakat anket değerlendirmesi sonucunda arboviral enfeksiyon yönünden risk taşıyan donörlerin serumlarında BNV antikor varlığı IFA testi ile de araştırıldı.

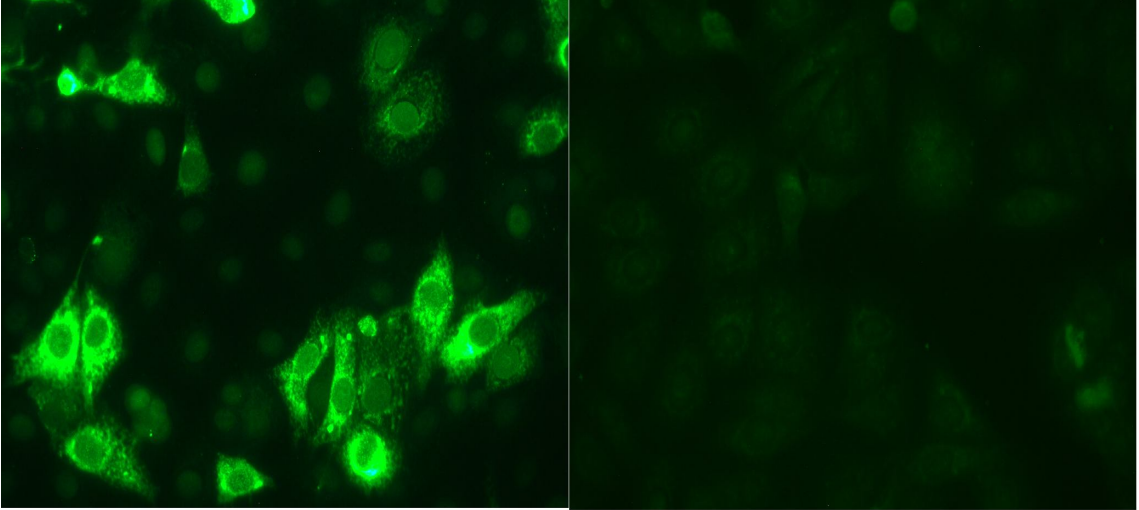
Donörlerin serumları 1/100 oranında dilüe edilerek BNV IFA testi yapıldı. IFA testi bulguları floresan mikroskopta (Eurostar II) pozitif ve negatif kontrol serumları ile alınan floresansın şiddeti ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 4-1). Sonuçlar kit prosedürüne göre semi-kantitatif olarak zayıf (1+), orta (2+) ve güçlü (3+) pozitif ve çok güçlü (4+) şeklinde yorumlandı.

BNV ELISA testi IgM ve IgG antikor pozitifliği bulunan 4 serum örneği BNV IFA ile değerlendirildi. Bu örnekler IFA ile de pozitif olarak bulundu. Örneklerin pozitiflik dereceleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

Anket verilerinde arboviral enfeksiyon yönünden yüksek risk faktörlerine (açık alanda bulunma, sivrisinek maruziyeti, evcil/kümes/binak hayvan bulundurma, çiğ süt tüketimi, ölü kuşa rastlama öyküsü, kene ısırma öyküsü) sahip olduğu tespit edilen 42 adet donöre ait serum örnekleri de BNV IFA testi ile IgM ve IgG antikor varlığı yönünden incelendi. Yapılan inceleme sonucunda 42 adet serum örneğinin 4 (%9,5)'ünde IFA ile BNV IgM pozitif saptanırken yine farklı 4 donörde de BNV IgG pozitifliği (n:4, %9,5) bulundu.

BNV IgM IFA pozitifliği saptanan 6 serum örneğinin 1'i zayıf pozitif (1+), 2'si orta pozitif (2+), 1 örnek güçlü pozitif (3+) ve 2 örnek çok güçlü pozitif (4+) olarak değerlendirilmiştir. IFA ile IgM pozitif bulunan donörlerin bulguları ve demografik özellikleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

BNV IgG IFA testinde pozitifliği saptanan 6 serum örneğinin 4'ü zayıf pozitif (1+), 2'si çok güçlü pozitif (4+) olarak değerlendirildi. IFA ile IgG pozitif bulunan donörlerin bulguları ve demografik özellikleri Tablo 4-4'de verilmiştir.



Şekil 4-1: BNV IFA IgM ve IgG yönteminde Pozitif ve Negatif kontrol serumlarının görünümü

4.4. BNV IgG ve IgM Antikor Pozitifliklerinin Risk Faktörlerine Göre Değerlendirilmesi

Marmara Bölgesinde yer alan 4 farklı kan merkezi ile yürüttüğümüz tez çalışmasında, gönüllü kan donörlerine ait anket verileri arboviral enfeksiyonlar açısından taşıdığı risk faktörleri yönünden incelendi. Yapılan değerlendirmede, arboviral enfeksiyonlar açısından en az herhangi bir risk faktörünü bulunduran donör sayısının 168 (168/226, %74) olduğu saptandı.

Risk faktörlerine sahip 168 donörden 6'sında (%3,5) ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM antikor ve 6 donörde (%3,5) ise BNV IgG antikor pozitifliği bulundu. IFA/ELISA testi ile BNV IgM ve IgG pozitifliği saptanan örneklerin test sonuçları ve donörlerin demografik özellikleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Donörlere ait anket verileri incelendiğinde son 6 ay içerisinde açık alanda bulunduğunu belirten donör sayısı 121 (121/226, %53,5)'dir. 121 donörün 6 (%5)'sında ELISA ve/veya IFA BNV IgM, 4'ünde (%3,3) BNV IgG antikor pozitifliği bulunmuştur.

Sivirisnek maruziyetini belirten donör sayısı 96'dır (96/226, %42,4). 96 donörün ELISA ve/veya IFA ile 5'inde (%5,2) BNV IgM, 5'inde (%5,2) BNV IgG antikor pozitifliği bulunmuştur.

Evcil/kümes/binek hayvan bulunduğunu belirten donör sayısı 60'tır (60/226, %26,5). 60 donörün 4'ünde (%6,6) ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM, 2'sinde (%3,3) BNV IgG antikor pozitifliği bulunmuştur.

Ölü kuşa rastladığını belirten 16 (16/226, %7) donördür. 16 donörün 3 (%18,7)'ünde ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM, 2'sinde (%12,5) BNV IgG antikor pozitifliği bulunmuştur.

Kene ısırma öyküsü bulunan donör sayısı 12 (12/226, %5,3)'dir. 12 donörün 1'inde (%8,3) ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM, 1'inde (%8,3) BNV IgG antikor pozitifliği bulunmuştur.

Çiğ süt tükettiğini belirten donör sayısı 78 (78/226, %34,5)'dir. 78 donörün 3'ünde (%3,8) ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM, 3'ünde (%3,8) BNV IgG antikorları pozitif bulunmuştur.

Son 6 ay içerisinde yurtdışına seyahati bulunan 16 donör, yurt dışı seyahatinde arboviral aşılama öyküsü bulunan 2 donör ve son 6 ay içerisinde yabancı fare teması bulunan 4 donörde ise antikor ELISA ve/veya IFA ile BNV IgM ve IgG pozitifliği saptanmamıştır.

Herhangi bir risk faktörü bulunmayan 58 donörden sadece 1(%1,7)'inde IFA ile IgG antikor pozitifliği saptanmıştır.

Tablo 4-3: IFA ve/veya ELISA testi ile BNV IgM pozitifliği saptanan örneklerin sonuçları ve demografik özellikleri

Örnek No/Çalışma Merkezi	Yaş/ Cinsiyet	Meslek	İkamet	Risk Faktörleri	ELISA BNV IgM*	IFA BNV IgM
4H/3/KOC	E/32	Serbest	Sakarya	Açık alanda bulunma	2,131 (Pozitif)	Zayıf (1+)
1H/3/TRK	E/33	Memur	Tekirdağ	Açık alan, sivrisinek, evcil/kümes hayvan bulundurma	0,288 (Negatif)	Güçlü (3+)
2H/4/TRK	E/24	Öğrenci	Edirne	Açık alan, evcil hayvan, sivrisinek, kene ısırığı, çiğ süt tüketimi	0,125 (Negatif)	Çok güçlü (4+)
2H/5/TRK	E/23	Öğrenci	Edirne	Açık alan, ölü kuşa rastlama, sivrisinek, çiğ süt tüketimi	0,771 (Negatif)	Orta (2+)
4H/1/TRK	E/21	Öğrenci	Edirne	Açık alan, evcil/kümes hayvan, ölü kuşa rastlama sivrisinek	0,349 (Negatif)	Orta (2+)
7H/2/TRK	E/28	Hayvancılık	Edirne	Açık alan, ölü kuşa rastlama, sivrisinek, çiğ süt tüketimi, evcil hayvan bulundurma	2,786 (Pozitif)	Güçlü (3+)

E: Erkek; K: Kadın; H: hafta; KOC: Kocaeli; TRK: Trakya;

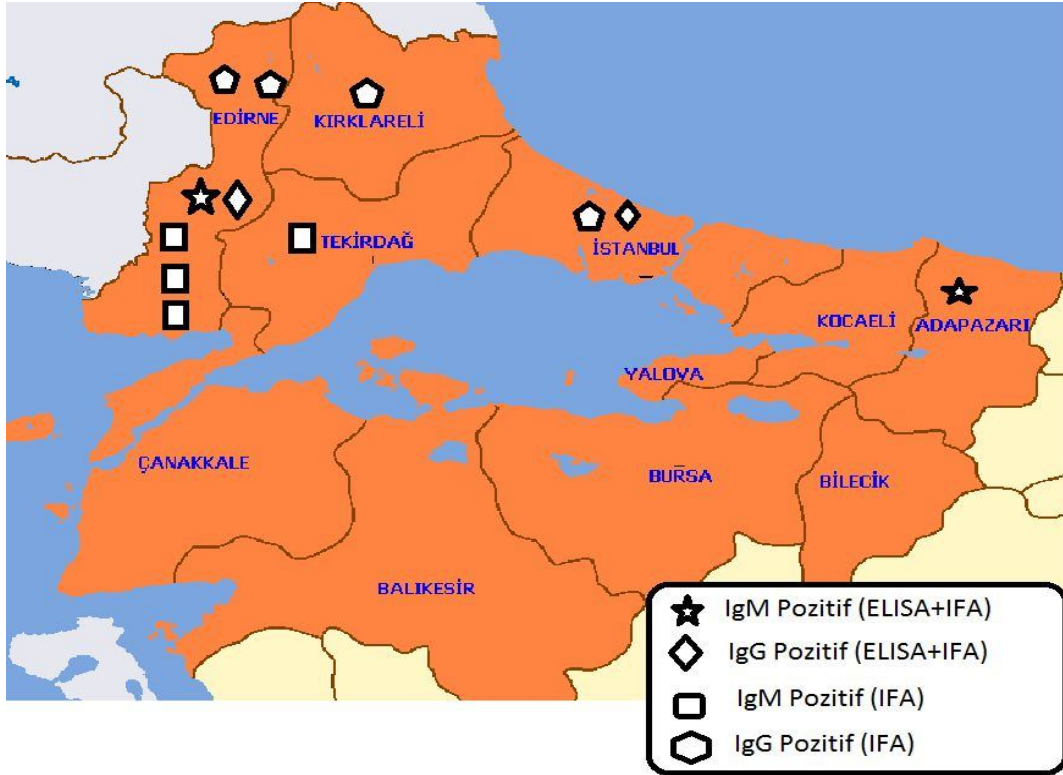
* IgM pozitiflik için sınır değer Ratio ≥ 1.1 , Negatif < 0.8 .

Tablo 4-4: IFA ve/veya ELISA testi ile BNV IgG pozitifliği saptanan örneklerin sonuçları ve demografik özellikleri

Örnek No	Yaş/ Cinsiyet	Meslek	İkamet	Risk Faktörleri	ELISA BNV IgG*	IFA BNV IgG
5H/5/CTF	K/32	Diğer	İstanbul	Çiğ süt tüketimi, sivrisinek maruziyeti	10,39 (Negatif)	Zayıf (1+)
8H/2/CTF	E/22	Öğrenci	İstanbul	Açık alanda bulunma, sivrisinek maruziyeti	111,3 (Pozitif)	Çok güçlü (4+)
2H/2/TRK	E/34	Çiftçi	Edirne	Açık alan, evcil/kümes hayvan, ölü kuşa rastlama sivrisinek, kene ısırma, çiğ süt tüketimi	<2 (Negatif)	Zayıf (1+)
3H/4/TRK	E/48	Serbest	Edirne	Açık alan, ölü kuşa rastlama, sivrisinek, kümes/evcil hayvan bulunma	3,44 (Negatif)	Zayıf (1+)
8H/4/TRK	E/44	Serbest	Kırklareli	Risk faktörü yok	10,32 (Negatif)	Zayıf (1+)
9H/1/TRK	E/38	Serbest	Edirne	Açık alan, sivrisinek, çiğ süt tüketimi,	129,9 (Pozitif)	Çok Güçlü (4+)

E: Erkek; K: Kadın; H: hafta; CTF: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi; TRK: Trakya;

*IgG değeri RU/ml biriminde olup, pozitiflik için sınır değer ≥ 22 RU/ml'dir.



**Şekil 4-2: Çalışmada antikor pozitifliklerinin illere göre dağılımı
(Herbir şekil bir hastaya tekabül etmektedir)**

4.5. BNV Real Time RT-PCR Sonuçları

226 donörün tamamından plazma örnekleri alınmıştır. Plazma örneklerinden yapılan ekstraksiyon ürünlerinden çalışılan BNV Real Time RT-PCR sonucunda hiç bir örnekte viral genom saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

BNV enfeksiyonu kan kaynaklarının güvenilirliğini tehdit eden, transfüzyonla bulaşan ve hafife alınmaması gereken ciddi bir enfeksiyon hastalığıdır. İlk olarak 1937'de Uganda'da bulunan virüsün, 1950'lerde Orta Doğu'da ateş ve ensefalit belirtili epidemilerin nedeni olduğu anlaşılana kadar, halk sağlığını tehdit eden bir ajan olarak görülmemiştir. Coğrafi dağılımı geniş bir yayılıma sahip olan başta *Culex* türü sivrisinekler olmak üzere birçok sivrisinek türü tarafından taşınarak kuş, insan ve diğer memeliler arasında yaşam döngüsünü sürdürmektedir. Virüsün yaşam döngüsünde yer alan vektörler ve kuşlar aracılığı ile ilk olarak keşfedildiği Afrika Kıtasından, birçok kıtaya geniş coğrafi yayılım göstermesi, BNV'nin çeşitli ekosistemlerde var olabilme ve varlığını sürdürebilme becerisini gösterir. Virüs bulaşında ve yayılımında etken vektörlerin çeşitliliği ile enfekte ettiği omurgalı hayvan türlerinin çeşitliliği göz önüne alındığında halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorun olduğu görülmektedir (88).

İlk keşfedildiği 1937'den beri varlığı Afrika, Avrupa, Asya, Ortadoğu ve Avustralya ile sınırlı olan BNV'nin 1999 yılı ve sonraki yıllarda Amerika Kıtası'nda salgınlar halinde görülmesi ve Amerika kıtasındaki hızlı yayılımı, arbovirüs bulaş döngüsünde yeterli vektör, uygun vertebralı konakçı ve uygun iklim şartları mevcut olduğu durumlarda yeni yerlerde ortaya çıkabildikleri gerçeğine dikkat çekmektedir. Özellikle hızla artış gösteren uluslararası ticaret ve seyahatlerin olması, egzotik patojenlerin kıtalararası kolaylıkla taşınabiliyor olması, peşpeşe görülen salgınlara ve virüsün yeni bölgelere yayılımına açıklık getirmektedir. Bu sebeple BNV enfeksiyonları ile baş etmede enfekte sivrisinek maruziyetinden korunma ve vektör kontrolü esas yaklaşım olmalı ve hekimler, veterinerler, halk sağlığı çalışanları, laboratuvar çalışanları impoerte hastalıkların sebep olduğu beklenmedik salgınlar açısından tedbirli olmalıdır (35,17,89).

BNV seroprevalansının dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. 1950'li yıllardan sonra BNV'nin neden olduğu salgınlar Akdeniz havzasında; İsrail ve Mısır , Ortadoğuda; Tunus ve Fas, Avrupa'da; Fransa, İtalya, Yunanistan, Romanya ve Rusya'dan bildirilmiştir. 1999 yılında BNV'nin Amerika New York City'de ilk olarak varlığı gösterilmiş ve 1999- 2001 yılları boyunca hızla kıtadaki diğer eyaletlere, ABD' nin doğu yarısına ve Kanada'nın güney bölgesine

yayılmıştır. 1999 yılında salgınlara ve ölümlere sebep olan virüs suşu ile yapılan genetik analizler sonucunda, İsrail'den bildirilen salgınlara New York salgınlarına sebep olan virüslerin birbiriyle benzer genetik özellikte olduğu gösterilmiştir (4,20).

Göçmen kuşlar, BNV'nin yeni bölgelere girişinde ve yayılımındaki esas konak, olarak nitelendirilmektedir. BNV'nin yayılımının asıl şüphelisi olarak göçmen kuşların nitelendirilmesinde öne sürülen görüşlerden biri; salgınların genellikle yaz mevsiminin sonunda ve sonbahar mevsimi başlangıcında görülmesi ile göçmen kuşların ve sivrisineklerin populasyon yoğunluğunun büyük konsantrasyonlara ulaşma dönemlerinin çakışmasıdır. Sıklıkla sulak alanların bulunduğu bölgelerde yada sulak alanlara yakın bölgelerde yaşayan insanlar arasında ortaya çıkan bu salgınların görüldüğü alanlar, çok sayıda ornitofilik sivrisinekler ile yüksek populasyon yoğunluğuna sahip kuşların temasının görüldüğü alanlardır (9,35).

Ülkemizin ekolojik şartlarının uygunluğuna ve coğrafi konumuna bakıldığında ve ülkemizin kuş göç yollarının üzerinde bulunması, bulaşta rol alan vektör faunası ve göçmen kuşların dinlenme ve beslenme alanları olan sulak alanların mevcudiyeti, Batı Nil virüsü enfeksiyonunun ülkemizdeki varlığını desteklemekte ve virüs dolaşımına açık bir konumda olduğunu göstermektedir (90).

BNV'nin ülkemizdeki varlığına dair yapılan çalışmalardan serolojik bulguların elde edildiği ilk çalışma Meço tarafından 1970'li yıllarda yapılmıştır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 937 kişinin serum örneklerinin hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle taranması sonucunda BNV pozitifliği %42 bulunmuştur (44). 2007 yılında Ergunay ve ark. tarafından Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yürütülen çalışmada, Şanlıurfa ve Siverek'ten toplanan 181 serum örneğinde BNV nötralizan antikor varlığı %9,4 olarak gösterilmiştir. 1970'li yıllarda yapılan çalışmada sonuçların plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile doğrulanmamış olması, HI testinin flavivirus grup spesifik antikorları tespit etmesi ve flaviviruslar arası çapraz reaksiyonların bulunması seropozitifliğin yüksek oranlarda bulunmasının sebebini açıklamaktadır (48,65). 1980 yılında Serter tarafından Ege Bölgesi'nde yürütülen çalışmada toplanan 231 serum örneğinde HI yöntemi ile seropozitiflik %29,1 bulunmuştur (46).

2006 yılında Özkul ve ark.'nın BNV seropozitifliğini saptamak amacıyla çeşitli bölgelerden, çeşitli memeli türlerine ait 764 serum örneği toplayarak yürüttükleri

çalışmada 88 insan serum örneğinde BNV seropozitifliği %20,4 olarak saptanmıştır (47).

Orta ve Kuzey Anadolu'da 2516 kan donörüyle yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada ise ELISA yöntemi ile %0,99 pozitiflik bulunmuş olup, pozitif bulunan örnekler PRNT yöntemi ile doğrulandığında %0,56 BNV pozitifliği saptanmıştır (49).

Başka bir geniş kapsamlı çalışma ise Ankara bölgesinde 2821 sağlıklı kan donörüne ait serum örnekleri ile yapılmış olup, ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada seropozitiflik oranının %2,4 olduğu gösterilmiştir (52). Ankara bölgesi 2011 yılında Şahiner ve arkadaşları tarafından 729 gönüllü kan donörü dahil edilerek yürütülen çalışmada 729 gerçek zamanlı RT-PCR analizleri sonucunda, çalışmaya dahil edilen serum örneklerinin hiçbirisinde BNV viral RNA varlığı saptanmamıştır (91).

BNV öncelikli olarak kuşlar arasında aktarılan ve insanların son konak olarak rol aldığı sivrisinek kaynaklı bir flavivirustur. BNV enfeksiyonu, 2002 yılında Amerika'da 44 eyalete yayılmış ve 4200 insan vakası bildirilmiştir. 2002 yılından önce BNV'nin kan transfüzyonuyla bulaşına dair herhangi bir vaka bildirilmemesine rağmen, enfeksiyon sonrası kısa süreli-geçici viremi görülmesi ve asemptomatik görülen enfeksiyonların oranının, orta şiddetli görülen enfeksiyonlara oranla daha yüksek olması transfüzyonla bulaş yolunun olası olduğu fikrini akla getirmiştir. Bu sebeple ABD'de 2003 yılında çeşitli kan merkezlerine başvuran kan donörlerinin NAT yöntemi ile taranması sonucunda 677,603 donörden 183'ü (%0,027) BNV RNA yönünden reaktif bulunmuştur. BNV RNA reaktif 183 donörün yalnızca 16'sında IgM pozitifliği saptanmıştır ve çalışmada düşük titrede viral yüke sahip donörlerden transfüzyonla bulaşın mümkün olduğu gösterilmiştir (92).

Kan transfüzyonu ve doku/organ transplantasyonu, birçok tıbbi uygulamada tamamlayıcı tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır. Ancak 2002 yılında ABD'de görülen epidemisi sırasında, transplantasyon uygulaması sonrası viremik bir organ donörüne ait dört organın (kalp, akciğer, iki böbrek) transplante edildiği alıcılardan üçünde BNV IgM pozitifliği saptanırken, bir alıcının beyin dokusundan virüs izole edilmiştir (56).

2004 yılında yine Amerika kıtasında, Kanada'da kan donörlerinin NAT testi ile rutin taramasında, kan bağışında bulunmak üzere başvuran 14 donörde BNV RNA

reaktif bulunmuş ve BNV RNA pozitif bulunan donörlerden yalnızca üçünde IgM pozitifliği saptanmıştır (93).

BNV'nin endemik olarak görüldüğü Avrupa ülkelerinden komşumuz Yunanistan'da 2006-2007 yılları arasında sağlıklı kan donörlerinden serum ve plazma örnekleri ile, aseptik menenjit bulguları görülen hastalardan BOS örneklerinin toplanması ile yürütülmüş olan çalışmada NAT yöntemi ile BNV RNA saptanamamıştır (94). Diğer bir Avrupa ülkesi olan İtalya'da 2009 yazında 5726 kan donörü NAT ile BNV virüs RNA'sı açısından taranmış ve bir donörde pozitiflik saptanmıştır. Çalışma sonucunda çok düşük oranda pozitiflik saptansa bile BNV bulaş riskini azaltmak için taramaya ihtiyaç olduğu yönünde görüş bildirilmiştir (95).

Ortadoğu ülkesi olan komşumuz İran'da ise BNV'nin, kan merkezlerinin kan temini açısından olası enfeksiyon riski olup olmadığını ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada, 500 sağlıklı kan vericisine ait serum örnekleri BNV IgM ve IgG antikor varlığı yönünden taranmıştır. Çalışmada IgM antikor pozitif örnek bulunamamış fakat 25 (%5) donörde BNV IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. Aynı çalışmada donörlere ait plazma örneklerinde BNV RNA varlığını araştırmak amacıyla real time RT-PCR yöntemiyle analizler yapılmış ancak viral RNA saptayamamışlardır(96).

Marmara Bölgesinde bulunan 4 farklı kan merkezine(CTF, TRK, KOC, SAK) kan bağışında bulunmak üzere başvuran kan donörlerinin serumunda BNV IgM ve IgG varlığını ELISA yöntemi ile araştırarak antikor varlığını tespit ettiğimiz örneklerde ise destekleyici olarak IFA testinin yapılması ve plazma örneklerinin tümünde ise real time RT-PCR ile BNV viral RNA'nın aranması amaçlanmıştır. Marmara bölgesinde 4 farklı ilde bulunan kan merkezlerinde kan bağışçılarına ait serum ve plazma örneklerinin 2014 yılı haziran-eylül ayları arasında toplanması ile çalışmanın bu bölgedeki BNV seroepidemiolojik verilerine katkıda bulunması öngörülmüştür.

2010 yılında Ülkemizde 47 BNV enfeksiyonu vakası (35 olası vaka, 12 laboratuarda doğrulanmış) gösterilmiştir. 2010 ve 2011 yıllarında rutin sürveyans ve seropozitiflik varlığı araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda Sakarya ilinden 12 vaka bildirilmiştir Bu vakalar rutin sürveyans sırasında tespit edilen ilk vakalardır. Özellikle ülkemizin batı illerinden bildirilen vakalarla BNV'nin Türkiye'nin batısında endemik olmaya başladığı görülmüştür. Bu sebeple yaptığımız çalışma kapsamına Marmara

Bölgesi'nden İstanbul, Edirne, Sakarya ve Kocaeli illeri kan merkezleri dahil edilmiştir (11).

Dört farklı merkezde 226 kan donöründen örneklerin haftalık bazda eş zamanlı olarak toplanmasıyla yürüttüğümüz çalışmada Sakarya ve Edirne illerine ait serum örneklerinde ELISA ile BNV IgM seropozitifliği %0,9 (2/226), ve İstanbul ve Edirne illerine ait serum örneklerinde ise BNV IgG seropozitifliği %0,9 (2/226) oranında saptanmıştır. Çalışmada saptanan izole IgM pozitifliği, ENIVD kriterlerine göre olası vaka olarak belirtilmektedir. Aynı zamanda Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı İçin Saha Rehberi'nde belirtilen kriterlerine göre sonuçlarımız "olası vaka" tanımlamasına uymaktadır (97,98) (Form 2).

2003 yılında BNV RNA (+) viremik kan donörleriyle; IgM, IgA, IgG tip antikorların ortaya çıkış sürelerini ve kandaki sürekliliklerini tespit etmek amacıyla çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada IgM ve IgA tip antikorların kanda en erken ortaya çıkışı BNV RNA pozitifliğinden sonra 3. gün görülmüş, 9. gün ise tüm donörlerde IgM ve IgA varlığı gösterilmiştir. IgG tip antikorların RNA pozitifliğinden sonra kanda en erken ortaya çıkışları 4. günde görülmüş, 16. gün sonunda tüm viremik donörlerin kanında IgG antikor pozitifleşmiştir. Aynı donör grubuyla yapılan çalışmada 21. günden sonra (22-440 güne kadar) IgM tip antikorların kandaki sürekliliğinin %88 olduğu saptanmıştır. BNV viral yük enfekte bir sivrisineğin ısırmasından sonra ortalama 8 gün içinde oluşmakta ve iki katına çıkmaktadır. Fakat kısa süreli viremi görülmesi BNV'ye ait RNA'nın kanda tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (99).

Çalışmamızda donörlerden toplanan tüm örnekler real time RT-PCR yapılmış fakat viral RNA saptanamamıştır. IgM pozitifliği saptanan örneklerde yada negatif örneklerde görülen durum vireminin kısa süreli olmasına, uzamış IgM serokonversiyonuna yada diğer flaviviruslarla çapraz reaksiyon vermelerinden kaynaklanabilir. Yine benzer şekilde ülkemizde İzmir'den, Yunanistan ve İran'da kan donörlerinde plazma örneklerinde real time RT-PCR yöntemiyle BNV viral RNA aranmış ancak bulunmadığı bildirilmiştir (52,94,96).

BNV için ELISA ile pozitif bulduğumuz örneklerin sonuçlarının teyit edilmesi duyarlılığı ve özgüllüğü görece olarak ELISA'dan daha yüksek bir test olan IFA ile yapılmıştır. ELISA ile pozitif bulunan örnekler IFA ile de pozitif bulunmuştur. Aynı zamanda ELISA ile negatif bulunan fakat anket verileri incelendiğinde arboviral

enfeksiyonlar açısından yüksek risk faktörlerini bulundurduğu kabul edilen 42 donöre ait örneğe IFA testi uygulanmış ve 42 örneğin 4 (%9,5)'ünde (9,5) IgM antikor pozitifliği, 4 (%9,5)'ünde ise IgG antikor pozitifliği saptanmıştır(Form 1). Türkiye Halk Sağlığı kurumunun belirttiği epidemiyolojik kriterler incelendiğinde pozitiflik saptadığımız donörlerde bu kriterlerin varlığı (hayvan ile temas, kene ısırma öyküsü, sivrisinek maruziyeti) görülmüştür. Aynı zamanda örneklerin toplanma süreci olarak belirlenen tarih aralıkları (15 haziran-15 eylül ayları) ülkemizin iklim ve ekolojik şartları sebebiyle sivrisinek popülasyonunun en sık görüldüğü aralıktır (98).

Yalnızca IFA ile IgM pozitifliği saptanan 4 örneğin 3 (%75)'ü Edirne ilimize bir örnek ise Edirne merkezli olup, donörün ikameti Tekirdağ ilidir. Yalnızca IFA ile IgG pozitifliği saptanan 4 örnekten 2(%50)'si Edirne ilimize, 1(%25) örnek Edirne merkezli olup ikameti Kırklareli iline, diğer 1 (%25) örneğin ise ikameti İstanbul ilimize aittir. Elde edilen sonuçlarda IgM ve IgG pozitifliklerinin salgınların sık görüldüğü Yunanistan'a hem sınır komşuluğu bulunan hemde ticaret/akrabalık/seyahat gibi sebeplerle giriş çıkışların sık görüldüğü Trakya Bölgesi'nde görülmesi anlamlı olarak görünmektedir (şekil 4-2). Yüksek risk faktörleri varlığı belirlenen gruptan, Edirne merkezli toplanan örneklerde yalnızca IFA testi sonuçlarında Kırklareli'nde ikamet eden donöre ait örnek IgG pozitif ve Tekirdağ ilinde ikamet eden donöre ait örnek IgM pozitif saptanmıştır. Sahadan toplanan sivrisinek türleriyle yapılan bir arboviral süreyans çalışmasında, BNV vektörü sivrisinek türlerinden *Ochlerotus caspius* ve *Culex pipiens* 'te sırasıyla BNV genotip 1 varlığı %15,6 ve %36,3 tespit edilmiştir. Bu çalışmayla beraber bulduğumuz sonuçlar Trakya Bölgesi'nde virüsün varlığına ve sirkülasyonuna işaret etmektedir. Ve bu bölgede daha geniş kapsamlı seroprevalans ve süreyans çalışmalarının yapılması gerekliliğini göstermektedir (90,100).

2010-2011 yıllarında Edirne, Manisa, Sakarya ve Muğla illerinde yürütülen rutin süreyans çalışmaları sırasında 47 BNV enfeksiyonu tespit edilmiş ve ilk kez akut BNV enfeksiyonu vakaları bildirilmiştir. Özellikle ülkemizin batı illerinden bildirilen vakalarla BNV'nin Türkiye'nin batısında endemik olmaya başladığı görülmüştür. Ülkemizin batısında ortaya çıkan bu olguların, yakın komşumuz Yunanistan'da aynı tarihlerde ortaya çıkan bir salgının hemen sonrasında saptanması, vektör ve rezervuar hareketlerinin ülkemizi yakından etkilediğini vurgulamaktadır (11,101). Kalaycıoğlu ve

ark'nın yaptığı çalışmada rutin sürveyans olgularının 37'si olası vaka, 12'si kesin vaka olarak tanımlanmıştır. Çalışmada akut BNV enfeksiyonu insidansı 0,19 bulunurken, 12 vakanın görüldüğü Sakarya ilinde en yüksek insidans (1,39) görülmüştür. 2010-2011 yıllarında akut vakaların görüldüğü Sakarya ili, kapsamlı sürveyans ve seroprevalans çalışmalarının yapılması açısından önem arz etmektedir. Çalışmamızda Sakarya ilinden 60 donöre ait örneğin belirlenen tarih aralıklarında toplanması planlanmıştır. Fakat çalışmamıza dahil edilen kan merkezindeki teknik aksaklıklar ve değişimler sebebiyle planlanan sayıda örnek toplanamamıştır. Toplanan 24 örnekte ELISA ile IgM ve IgG pozitifliği ve real time RT-PCR ile viral RNA saptanamamıştır. Fakat Kocaeli ilindeki çalışma dahilinde olan kan merkezine başvuran donörlerden ikamet adresi Sakarya olan bir donörün örneğinde ELISA ile IgM pozitifliği saptanmış ve IFA testi ile de IgM pozitifliği teyit edilmiştir (11).

İzmir'de 2010 yılında Ege Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran sağlıklı 438 kan donörüyle yapılan çalışmada tüm örneklerde viral RNA negatif bulunmuştur. Fakat 11(%2,51) örnekte IgG antikor pozitifliği bulunmuştur. Yaptığımız çalışma sınırlı sayıda kan donörünü kapsamına rağmen bulunan seropozitiflik oranı ülkemizin batısında yapılan çalışmalarla düşük oranlarda da olsa paralellik göstermekte olup virüsün bölgedeki populasyon arasında sirkülasyonuna işaret etmektedir. Çalışmada saptadığımız pozitifliklerde BNV'nin diğer flaviviruslarla verebileceği çapraz reaksiyon ihtimali de dikkate alınarak, tüm örnekler BNV RNA negatif bulunmuş olmasına rağmen, bölgede saptanılan seropozitiflikler, virüsün sirkülasyonda olduğu ve kan ürünleriyle bulaş riskinin gözardı edilmemesi gerektiğine işaret etmektedir. Bu sebeple ülkemizde kan donörlerinde BNV taraması yapılmadığından, yüksek viral aktivitenin görüldüğü yaz mevsiminde kan merkezlerinde BNV enfeksiyon bilincine dayalı, daha ayrıntılı donör formlarının hazırlanması, asemptomatik BNV viremik donörlerin elenmesine yardımcı olacaktır (102,103,104,106).

Seropozitiflik oranının belirlenmesinde ELISA yöntemini kullandığımız çalışmamızda, ELISA ile pozitif bulduğumuz örneklerde ve ELISA sonuçları negatif olan fakat risk faktörleri bulunduran donörlerin örneklerine teğit amacıyla IFA testi uygulandı. Çalışmada ELISA sonuçları negatif bulunan 8 örnekte IFA ile pozitiflik saptanmış olması kantitatif ELISA testi değerleri ile kalitatif IFA testi sonuçları arasında korelasyon olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda bulduğumuz BNV IgM

ve IgG antikor pozitifliklerinin daha duyarlı bir test olan PRNT ile doğrulanması gerekliliğine rağmen, çalışma bütçesinin kısıtlılığı, donanımlı bir viroloji laboratuvarı gereksinimi, canlı virus suşunun temin edilebilme ve uygun hücre kültürlerinde üretilebilme sorunu, teknik ekipman ve deneyimli personel eksikliği gibi faktörden ötürü PRNT testi yapılamamıştır.

Tüm bu sonuçlar, BNV enfeksiyonu yönünden ülkemizin özellikle Trakya ve Marmara Bölgesinin risk altında olduğunu ve kapsamlı epidemiyolojik ve sürveyans çalışmalarının yapılması gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Murray KO, Walker C, Gould E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: A decade of advancements in research since its introduction into Western Hemisphere. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139: 807-817.
2. Monini M, Falcone E, Busani L, Romi R, Ruggeri FM. West Nile virus : Characteristics of an African virus adapting to the third millennium world. *Open Virol. J.* 2010; 22: 42-51.
3. Smithburn K, Hughes T, Burke A. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med.* 1940; 20: 471-492.
4. Sejvar JJ. West Nile virus; an historical overview. *Ochsner J.* 2003; 5(3): 6-10
5. Murgue B, Murri S, Triki H. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 951: 117-126.
6. Lindenbach BD, Murray CI, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. *Fields Virology*, 6th Ed. In Knipe DM, Howley PM, eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia),2013; pp 712-746
7. Philip CB, Smadel JE. Transmission of West Nile virus by infected *Aedes albopictus*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1943; 53: 49-50.
8. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005a; 11(8): 1174-9.
9. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* 2005b; 11:1167-1173
10. Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, Charrel R, Donoso-Mantke O, Escadafal C et al. Diagnosis of West Nile Virus Human Infections:

Overview and Proposal of Diagnostic Protocols Considering the Results of External Quality Assessment Studies. *Viruses* 2013; 5(10): 2329-2348.

11. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O ve ark. Emergence of West Nile virüs infection in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Eurosurveillance*. 2012. 17: pp. 20182
12. 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 Surveill*. 2010; 15: pii: 19644.
13. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med*. 1956; 5: 579–620
14. Reiter P. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill*. 2010; 15: 19508
15. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever-a reemerging mosquito- borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5: 643–650
16. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician*. 2003; 68: 653-60
17. O’Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, et al. The epidemic of West Nile virus in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2004; 4 :61-70
18. Monarth PT, Heinz XF. Flaviviruses. In: Fields NB, editors. *Virology*. 3rd.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996: 961-1034
19. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*.1999; 286: 2333-2337.
20. 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: 96–105.
21. Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E et al. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect Genet Evol*. 2013; 17: 46-50.
 22. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 67
 23. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 171-81
 24. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In *Fields virology*, vol 1, 5th ed. In Knipe DM, Howley PM, eds. (Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia), 2007; pp 1101-1113
 25. Adams SC, Broom AK, Sammels LM, Hartnett AC, Howard MJ, Coelen RJ et al. Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates. *Virology* **1995**; 206: 49–56.
 26. 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.
 27. Valiakos G, Athanasiou LV, Touloudi A, Papatsiros V, Spyrou V, Petrovska L. West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence, Viral Replication. INTECH Open Access Publisher. 2013; doi: 10.5772/55198.
 28. Pierson TC, Diamond MS. Flaviviruses. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Wolters Kluwer/Lippencott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 747–794
 29. Bogachek MV, Zaitsev BN, Sekatskii SK, Protopopova EV, Ternovoi VA, Ivanova AV et al. Characterization of glycoprotein E C-end of West Nile virus and evaluation of its interaction force with alphaVbeta3 integrin as putative cellular receptor. *Biochemistry*. **2010**; 75: 472–480

30. Margo A, Brington, Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus, *Viruses* **2014**; 6: 13-53
31. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity : the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012; 2:168-175
32. Ambrose RL, Mackenzie JM. ATF6 signaling is required for efficient West Nile virus replication by promoting cell survival and inhibition of innate immune responses. *J. Virol.* **2013**; 87: 2206–2214
33. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol.* 1993; 67(3):1672-5.
34. Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev.*2008; 1: 71-86
35. Rappole JH, Hubalek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 47-58
36. Turell MJ, O’Guinn M and Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 413-414
37. Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Ratz F, Skare J and Bakonyi T. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7:181-18
38. Paz S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Philos T Roy Soc B.* 2015; 370(1665): 20130561
39. Parreira R, Severino P, Freitas F, Piedade J, Almeida APG, Esteves A. Two distinct introductions of the West Nile Virus in Portugal disclosed by phylogenetic analysis of genomic sequences. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7: 344-352
40. Austin RJ, Whiting TL, Anderson RA, Drebot MA. An outbreak of West Nile virus associated disease in domestic geese (*Anserdomesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can Vet J.* 2004; 45:117-23.

41. Heperkan Y, Arı A. Türkiye’de ARBOR virusları üzerinde bir çalışma. *Türk Hij Tecr Biyol Derg.* 1964; 24: 113-7.
42. Serter F. Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *EU Tıp Fak Mec.*1968; 7: 1-13.
43. Radda A. Antibodies against group A and group B arboviruses in domestic animals from Turkey. *Ege Üni. Tıp Fak. Mec.* 1971; 10: 227.
44. Meço O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutinationinhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 1977;11:3-17
45. Arı A. Türkiye’de Arbovirüslerin faaliyeti ve ekolojisi üzerine incelemeler. *Türk Hij Tecr Biyol Derg.* 1972; 32: 134-143.
46. Serter D. Present status of arbovirus sero -epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zbl Bakt S.* 1980; (9):155-61
47. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcalı A, Yılmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol infect.* 2006; 134(4):826-9.
48. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S. 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: 157-61
49. Ergunay K, Saygan MB, Aydoğan S, Menemenlioglu D, Turan HM, Ozkul A, Us D. West Nile virus seroprevalence in blood donors from central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010(a); 10: 771-5. (a)
50. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Ankara Bölgesinde Nedeni Bilinmeyen Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Batı Nil Virüsünün Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010(b); 44: 255-262.(b)
51. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A ve ark. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *Int J Infect Dis.* 2013;17(7): 546-551
52. Hızel K, Yenicesu İ, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan I, Kalkancı A, Dilsiz ve ark. Sağlıklı kan vericilerinde Batı Nil virusunun araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44: 425-30.

53. Hayes EB, O'Leary DR. West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*. 2004; 113:1375–81.
54. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al. et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the U.S. *N Engl J Med*. 2003; 349:1236-45.
55. Centers for Disease Control and Prevention. Transfusion-associated transmission of West Nile virus—Arizona, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004; 53:842–4.
56. 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. *New Engl J Med*. 2003; 348(22): 2196-203.
57. Kumar D, Prasad GV, Zaltzman J, Levy GA, Humar A. Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2004; 77: 399–402.
58. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired West Nile virus infections—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002; 51: 1133–5.
59. Monath TP, Cropp CB, Harrison AK. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab. Invest*. 1983; 48(4):399-410.
60. Diamond SM. Evasion of innate and adaptive immunity by flavivirus. *Immunol Cell Biol*. 2003; 81: 196-206
61. Castillo OJ, Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 2004; 35(4):467-83
62. Lazear HM, Pinto AK, Vogt MR, Gale M, Diamond MS. Beta Interferon Controls West Nile Virus Infection and Pathogenesis in Mice. *J Virol*. 2011; 85(14):7186-94.
63. Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 2009; 397:130–138.

64. Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev.* 2008; 225: 212-25.
65. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(6):731-41
66. Tezcan S, Ülger M, Emekdaş G. Batı Nil Virusu ve enfeksiyonu. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg.* 2011; 4(3):9-17
67. Weiss D, Carr D, Kellachan J, et al. Clinical findings of West Nile Virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey 2000. *Emerg Infect Dis* 2001;7:654-9.
68. Giladi M, Cotter ME, Martin AD, et al. West Nile encephalitis in Israel 1999: The New York connection. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 659-61.
69. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M. Surveillance for human West Nile virus disease. *MMWR Surveill Summ.* 2010; 59(2):1-17.
70. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol.* 2006; 80: 9349-60.
71. Epstein JS. Insights on donor screening for West Nile virus. *Transfusion* 2005; 45:460-2
72. Mather T, Takeda T, Tassello J, Ohagen A, Serebryanik D, Kramer et al. West Nile virus in blood: stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion.* 2003; 43: 1029–1037
73. Centers for Disease Control and Prevention, West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control, 4th Revision June 14, 2013
74. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med.* 2010; 30(1):47-65.
75. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA.* 2013;310(3):308-315.
76. Tosun S. Batı Nil virüs enfeksiyonu. *J Exp Clin Med.* 2012; 29: 183-S192
77. 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.

78. Kapoor H, Signs K, Somsel P, Downes FP, Clark PA, Massey JP. Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J. Clin. Virol.* 2004; 31: 289–291.
79. Centers for Disease Control and Prevention. Information and guidance for clinicians: West Nile virus: clinical description. 2004. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/clinicians/clindesc.htm>
80. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine.* 2007; 25: 5563–5576
81. Sampathkumar P. West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78: 1137-44
82. Lanciotti SR, Kerst JA, Nasci SR, 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. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4066-71.
83. Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1511–1518.
84. Tilley PA, Fox JD, Jayaraman GC, Preiksaitis JK. Nucleic acid testing for West Nile virus RNA in plasma enhances rapid diagnosis of acute infection in symptomatic patients. *J Infect Dis.* 2006;193(10):1361-1364.
85. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB. West Nile Virus Neuroinvasive Disease. *Ann Neurol* 2006; 60: 286–300
86. Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virus infection in mice. *J Infect Dis* 2003; 188:5–12.
87. Iyer AV and Kousoulas KG. A Review of Vaccine Approaches for West Nile Virus. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10: 4200-4223
88. HALE D. West Nile Virus: An Overview. *Home healthcare now.* 2015; 33(5): 260-264.
89. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001; 344(24): 1807-1814.

90. Ergunay K, Gunay F, Oter K, Kasap OE, Orsten S, Akkutay AZ et al. Arboviral surveillance of field-collected mosquitoes reveals circulation of West Nile virus lineage 1 strains in Eastern Thrace, Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 2013; 13(10): 744-752.
91. Şahiner F, Avcı İY, Bedir O, Koru Ö, Şener K, Yapar M, ve ark. Kan Donörlerinde Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Batı Nil Virüsü RNA'sının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46(3):464-9.
92. Bush MP, Caglioti S, Robertson EF, McAuley JD, Tobler LH, Kamel H et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med.* 2005; 353(5): 460-467.
93. 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):487-491
94. Kantzanou MN, Moschidis ZM, Kremastinou G, Levidiotou S, Karafoulidou A, Politis C et al. Searching for West Nile virus (WNV) in Greece. *Transfusion Med.* 2010; 20(2):113-117.
95. 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)
96. Sharifi Z, Shooshtari MM, Talebian A. A study of West Nile virus infection in Iranian blood donors. *Archives of Iranian medicine.* 2010; 1(13): 1-4.
97. European Network for Diagnostic of Imported Viral Diseases (ENIVD). Viral Diseases. West Nile Fever, Case Definition. 2013. http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm
98. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Viroloji/Mikrobiyolojik Tanımlama/ V-MT-15/ Sürüm 1.1 /01.01.2015
99. 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. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9): 4316-4320.
100. Papa A. West Nile virus infections in Greece: an update. *informahealthcare.com.* 2012; 743-750. (doi:10.1586/eri.12.59)

101. 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 Surveill.* 2010; 15: pii: 19644. .
102. Bicerlioglu SU, Karataylı E, Bayram A, Turhan A, Degirmenci A, Aydınok Y et al. Investigation of West Nile virus among healthy blood donors in the western part of Turkey. *Turk J Med Sci.* 2015; 45: 84-88
103. Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Coulpier M ve Lecollinet S. Differential Virulence and Pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses.* 2013; (5): 2856-2880
104. Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, et al. Family: *Flaviviridae*. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al., eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Academic Press; 1999. p. 859-78
105. Kalaycıoğlu H. Türkiye’de görülen West Nile vakalarının epidemiyolojisi. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 2010:174-83.
106. Ciota AT and Kramer LD. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses.* **2013**; 5(12): 3021-3047; doi:[10.3390/v5123021](https://doi.org/10.3390/v5123021)
107. Solomon T , Ooi MH, Beasley DW, Mallewa M. West Nile encephalitis, *BMJ.* 2003; 326: 865-869

FORMLAR



TIBBİ HUKUK VE ETİK ENSTİTÜSÜ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ



Kan Donörlerinde Batı Nil Virüsü (BNV) Seroprevalansının Saptanması

Ad /Soyadı:..... Yaşı:.....

Cinsiyeti: E K Mesleği :

Sürekli yaşadığı yer : Köy: İlçe:..... İl:.....

1. Son 6 ay içerisinde iş ya da hobiniz gereği kırlık, çalılık veya ormanlık alanlarda bulundunuz mu? (Çiftçi, mevsimlik işçi, avcı, doğa yürüyüşü, düzenli piknik, vb.)

A) Evet B) Hayır (Alan ve aktivite türü hakkında açıklama):

2. Yaşadığınız veya çalıştığınız alanda sivrisinek veya kene gibi böceklerle karşılaşır mısınız?

A) Evet B) Hayır (Tür ve karşılaşma sıklığı hakkında açıklama) :

3. Yaşadığınız ya da çalıştığınız alanda (ev, işyeri, ya da sık gittiğiniz bir ortamda) evcil hayvan, kümes hayvanı ya da binek hayvanı var mı?

A) Evet B) Hayır (hayvanların isimleri) :.....

4. Yaşadığınız veya çalıştığınız alanda ölü kuşlara (güvercin, serçe, karga, kırlangıç vb.) ya da başka kanatlı hayvanlara rastladınız mı?

A) Evet B) Hayır (Hayvanların isimleri ve karşılaşma sıklığı) :.....

5. Bugüne kadar hiç kene tarafından ısırıldınız mı? Ev halkının ya da çalışma arkadaşlarınızın herhangi birinden kene tarafından ısırıldıklarına dair duyum aldınız mı?

A) Evet B) Hayır (..... Yıl, ay gün önce)
(Isırılan kişinin yakınlığı hakkında açıklama) :

6. Pastörize edilmemiş süt ürünleri (açıkta satılan süt, taze peynir vb.) tüketir misiniz?

A) Evet B) Hayır (Gıda türü ve tüketim sıklığı hakkında açıklama) :

7. Uzun süreli yurt dışında (özellikle Afrika, Asya, Avrupa ve Amerika ülkelerinde) bulundunuz mu ?

A) Evet B) Hayır (Ülke isimleri ve bulunma süreleri):

8. Yurt dışına giriş çıkışlarda ya da orada yaşadığımız süre boyunca hiç Sarı humma, Kene ensefaliti aşısı ya da başka bir aşı oldunuz mu?

A) Evet B) Hayır (ülke isimleri ve yapılan aşılar):

9. Son 6 ay içinde yabani fare veya herhangi bir kemirici ile temasınız oldu mu?

A) Evet B) Hayır (açıklamalar ,ısırdırma durumu):

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU BAŞKANLIĞI

BATIL NİL VIRUS ENFEKSİYONLARI LABORATUVAR İSTEM VE VAKA BİLGİ FORMU

EPİDEMİYOLOJİK BİLGİLER

Bulaş Yolu

- Hastalığın başlangıcından önceki 3 hafta içinde sivrisinek sokması (İlini belirtiniz).....
- Vaka anne sütüyle beslenen bir bebek
- Vaka inutero enfekte olmuş bir bebek
- Laboratuvarдан edinilmiş bir enfeksiyon (Evet ise, Laboratuvarın açık adını yazınız).....
- Hastalığın başlangıcından önceki 3 hafta içinde doğrudan kuşla temas
- Son 8 hafta içinde kan, plazma veya kan ürünleri bağışında bulunma*
- Son 4 hafta içinde kendisine kan, plazma/kan ürünleri bağışı yapılması*
- Son 8 hafta içinde organ veya doku bağışında bulunma*
- Son 8 hafta içinde kendisine organ veya doku nakli yapılması*
- Başka bulaş yolu (Tanımlayınız):.....

SİZCE EN OLASI BULAŞ YOLU:

- Sivrisinek
- Kuş teması
- Kan, plazma ya da kan ürünü
- Organ/Doku Nakli
- Anne Sütü
- İnutero
- Laboratuvar

* Eğer vaka kan/plazma/trombosit/kemik iliği/organ veya doku vericisi ve/veya alıcısı ise, lütfen Sağlık Müdürlüğü ile temasa geçiniz

Seyahat Öyküsü

- Semptomların başlamasından önceki 3 hafta içinde, ikamet edilen yerden ülke, il, ilçe, köy dışına seyahat öyküsü

Gidilen yer/ler

Ülke	İl	İlçe	Köy	Gidiş Tarihi	Dönüş Tarihi
1.			/...../...../...../.....
2.			/...../...../...../.....
3.			/...../...../...../.....
4.			/...../...../...../.....
5.			/...../...../...../.....

AŞILAMA DURUMU

Sarı humma aşısı yapıldı mı? Evet Hayır Bilmiyor

Aşının Yapıldığı Tarih:/...../.....

HASTANIN SON DURUMU

- Taburcu oldu
- Poliklinik hastası
- Yatan hasta (Servis)
- Yatan hasta (Yoğun Bakım)
- Öldü

Ölüm Tarihi:/...../.....

İletişim Bilgileri:

Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı
Yeni ve Yeniden Önem Kazanan Zoonotik Hastalıkların
Kontrolü Birimi
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Yenışehir/ANKARA
Tel: 0312 565 56 77/76 Faks: 0312 565 56 81

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Yenışehir/ANKARA
Tel: 0312 565 56 31/55 47 Faks: 0312 565 55 69

Doldurulan formları zoonotik.vektorel@thsk.gov.tr ve viral.zoonoz@thsk.gov.tr e-posta adreslerine elektronik olarak ve bir nüshasını numune ile birlikte Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı'na, diğer nüshasını Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı'na gönderiniz!

SAYFA -2

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/604/02-12332
Konu:

İstanbul/...../.....

09 Mayıs 2014

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İlgi: 16.04.2014 tarihli, 76624604-588 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Yavuz UYAR'ın danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Esra BAKIR'ın yürütücülüğünde Prof.Dr.Zafer BAŞLAR, Prof.Dr.Muzaffer DEMİR, Doç.Dr.Mehmet KÖROĞLU ve Prof.Dr.Birsen MUTLU'nun yardımcı araştırmacı olarak görev aldıkları "Batı Nil Virüsü Varlığının Marmara Bölgesi Kan Donörlerinde Serolojik ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 06 Mayıs 2014 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim

Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:
1 dosya

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	BAKIR
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	02.04.1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	51718161460
Email	bakir.esr@gmail.com	Tel	5344730199

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2015
Lisans	Trakya Üniversitesi	2012
Lise	Davutpaşa (YDA) Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	Iyi	iyi	66	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Ofis Programları (Word, Excel ve PowerPoint)	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**