

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KAN DONÖRLERİNDE
BATI NİL VİRUSU (BNV) SEROPREVALANSININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şeniz AYTURAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA
2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KAN DONÖRLERİNDE
BATI NİL VİRUSU (BNV) SEROPREVALANSININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şeniz AYTURAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. A. Dürdal US

ANKARA

2010

TEŞEKKÜR

Bu tezin başlangıcından en son cümlesine kadar her aşamasında çok büyük emeği, bilgisi, tecrübesi, fedakarlığı ve özverisi olan; gerek bu tez gerekse asistanlığım döneminde birlikte çalıştığım zamanlardaki her türlü işte en ince ayrıntılarla defalarca ilgilenen; çok değerli zamanından ödün veren; sevgisini, hoşgörüsünü, idealistliğini, ufkunun genişliğini, çalışkanlığını, saygınlığını örnek aldığım; kendisinden çok şey öğrendiğim tez danışmanım çok değerli Prof. Dr. A. Dürdal US' a sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim süreci içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda desteklerini gördüğüm, hoşgörü ortamı içerisinde geniş tecrübeleri ile bizlere yön veren çok saygıdeğer hocalarıma; tez çalışmam sırasındaki yardım ve katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Koray Ergünay ve Uzm. Dr. Sibel Aydoğan'a; desteklerini esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarıma ve tüm yardımlarından dolayı İrfan Atmaca ve diğer teknisyen arkadaşlara tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, dualarını esirgemeyen; kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli anne ve babam Hülya-Köksal Bulut' a ve hayatıma renk katan kardeşlerime en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yoğun çalışma temposu nedeniyle yanımda olamadığı zamanlarda bile yüreğindeki sevgiyle hep yanıbaşımdaya olduğunu hissettiğim, eşim Enis Bahadır Ayturan'a gösterdiği sabır, hoşgörü ve iyi niyeti için tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Ayturan, Ş. Hacettepe Üniversitesi Kan Donörlerinde Batı Nil Virusu (BNV) Seroprevalansının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2010. *Flaviviridae* ailesi içinde sınıflandırılan Batı Nil virusu (BNV), zarflı, ikozahedral yapılı, tek iplikli pozitif polariteli bir RNA virusudur. İnsana sivrisinek (özellikle *Culex* spp.) ısırmasıyla bulaşan BNV, asemptomatik enfeksiyonlardan ciddi meningoensefalite kadar değişen geniş bir spektrumda klinik tablolar oluşturabilmektedir. İlk kez 1937'de Uganda'nın Batı Nil bölgesinde ateşli bir hastadan izole edilen BNV, 1999 yılına kadar Afrika, Orta Doğu, Hindistan, Batı ve Orta Avrupa gibi Eski Dünya ülkeleri ile sınırlı kalmış, Ağustos 1999'daki New York salgını ile Kuzey Amerika'ya ulaşmış ve Amerika kıtasında da hızla yayılarak artropod kaynaklı en önemli hastalık etkenleri arasında yerini almıştır. BNV'nun doğadaki yaşam döngüsü kuşlar ve sivrisinekler arasında gerçekleşmekte, at ve insan gibi omurgalılar ise tesadüfi konak olmaktadır. Ülkemizde BNV enfeksiyonu varlığı, 1977 yılındaki ilk serolojik çalışmayı takiben, günümüze kadar yapılan çeşitli araştırmalar ile gösterilmiştir. Son yıllarda, Eski ve Yeni Dünya ülkelerinde BNV salgınlarında görülen artış, virusun yeniden önem kazanmasına neden olmuş ve hastalığın seyrinde menenjit/ensefalit tablosunun öne çıkması, virülansının arttığını vurgulamıştır. Bu çalışma ile, seçilmiş sağlıklı bir popülasyonda BNV seroprevalansının belirlenmesi, doğrulanması ve enfeksiyonun bölgemizdeki güncel durumu hakkında bilgi sağlanarak Türkiye verilerine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Nisan-Aralık 2009 tarihlerinde Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran 1200 kan donörüne ait serum örneği dahil edilmiştir. Donörlerin 400'ü kadın, 800'ü erkek olup, yaşları 18-61 yıl arasında (ortalama: 37.8) değişmektedir. Serum örneklerinde BNV IgG antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmış; taramada pozitif bulunan örneklerle, virus ile karşılaşma zamanının belirlenebilmesi için BNV IgG avidite testi uygulanmıştır. BNV IgG antikor pozitifliğinin doğrulanması ise, indirekt immünofloresan antikor (IFA) testi ve referans yöntem olarak kabul edilen plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile yapılmıştır. Çalışmada; 19 (%1.6) donöre ait serum örneğinde ELISA ile BNV IgG antikor pozitifliği saptanmış ve örneklerin tümünde yüksek aviditeli IgG antikorları tespit edilmiştir. Doğrulamaya alınan 19 serum örneğinin 15'i (%78.9) IFA ile, 10'u (%52.6) ise PRNT testi ile pozitif bulunmuştur. Flaviviruslar arasında ortaya çıkabilen çapraz reaksiyon olasılığına karşı araştırılan 19 örneğin üçünde ELISA ile Dengue virus IgG, ikisinde ise IFA ile sarı humma virusu IgG antikorları pozitif bulunmuş; ELISA ile kene ensefaliti virusuna karşı IgG antikor pozitifliğine rastlanmamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, ELISA ile kan donörlerinin %1.6 (19/1200)'sında saptanan pozitiflik, altın standart yöntem olan PRNT ile %0.8 (10/1200) olarak doğrulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, bölgemiz için düşük oranda bulunmasına rağmen, ülkemizdeki BNV enfeksiyonlarının, süveyans ve kontrol programları içerisine dahil edilebilir özellikte olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Batı Nil virusu, kan donörü, seroprevalans, ELISA, IFA, PRNT.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 09A101004).

ABSTRACT

Ayturan, Ş. Investigation of West Nile Virus (WNV) Seroprevalence in Hacettepe Hospital Blood Donors. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Specialist Thesis, Ankara, 2010. West Nile virus (WNV), a member of *Flaviviridae* family, is an enveloped, icosahedral symmetric, single-stranded positive-sense RNA virus. WNV is transmitted to humans by infected mosquito (mainly *Culex* spp.) bites and cause a variety of clinical outcomes, ranging from asymptomatic infection to severe meningoencephalitis. WNV was first identified in 1937 from a febrile patient in West Nile region, Uganda. Geographical distribution of WNV was limited to the Old World, namely Africa, the Middle East, India, western and central Europe until 1999, however, the virus has reached to United States with the New York City outbreak in August 1999. WNV has then spread rapidly in America, becoming an important arthropod-borne virus infection with public health concern. The natural life cycle of WNV is between birds and mosquitos, whereas horses and humans are accidental hosts. The presence of WNV infections in our country has been first shown serologically in 1977, and since then WNV activity has been confirmed in Turkey by different studies. An increasing trend of epidemics in both Old and New World countries, has lead WNV to come into question recently, and the predominancy of meningitis/encephalitis cases has emphasized an increase in its virulence. The aims of this study were to determine and confirm the BNV seroprevalence in a chosen healthy population and to provide epidemiological data for Turkey about the recent status of the infection at our region. A total of 1200 serum samples collected from blood donors (400 were female, 800 were male; age range: 18-61, mean age: 37.8 years) who were admitted to Hacettepe University Hospital Blood Donation Center between April to December 2009, were included to the study. The presence of WNV IgG antibodies were screened by ELISA, and the positive samples have been further investigated by WNV IgG avidity test in order to estimate the encountering time of infection. Indirect immunofluorescence antibody (IFA) test and plaque reduction neutralization test (PRNT) which is accepted as reference method, were performed for the confirmation of WNV IgG positive results. Nineteen (1.6%) of the samples yielded WNV IgG positivity with ELISA, and all of which were IgGs with high avidities. Of 19 samples that were taken into confirmation tests, 15 (78.9%) were found positive with IFA, and 10 (52.6%) were found positive with PRNT. WNV IgG positive samples were also tested for the presence of IgGs against dengue (DENV), tick-borne encephalitis (TBEV) and yellow fever (YFV) viruses, in terms of probability of cross reactions which are common between flaviviruses. DENV IgG positivity was found in three samples by ELISA, YFV IgG positivity was found in two by IFA, and none was found positive for TBEV by ELISA methods. As a result, the positivity rate (19/1200; 1.6%) of WNV IgG detected by ELISA in blood donors has been confirmed as 0.8% (10/1200) by a gold standart method, PRNT. The data of this study indicated that the prevalence of WNV infections, although low in our region, deserves to considered in surveillance and control programs related to WNV in Turkey.

Keywords: West Nile virus, blood donor, seroprevalence, ELISA, IFA, PRNT.

This thesis has been supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (Project no: 09A101004).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	5
2.2.1. Moleküler Epidemiyoloji	6
2.3. Virusun Yapısı ve Genomu	7
2.4. Viral Proteinler	7
2.5. Virusun Replikasyonu	10
2.6. Virusun Doğadaki Yaşam Döngüsü	13
2.7. Patogenez ve İmmün Yanıt	15
2.8. Klinik Bulgular	18
2.9. Epidemiyoloji	20
2.9.1. Bulaş Yolları	20
2.9.2. Risk Grupları	21
2.9.3. Coğrafi Dağılım	22
2.9.4. Ülkemizdeki Durum	25
2.10. Tanı	27
2.10.1. Serolojik Testler	28
2.10.2. Moleküler Testler	30
2.10.3. Virus İzolasyonu	31
2.10.4. Antijen Testleri	31

2.11. Tedavi	32
2.12. Korunma	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Kan Donörleri	35
3.1.1. Etik Kurul Onayı	35
3.1.2. Çalışmaya Alınacak Donör Seçimi ve Bilgilendirilmesi	35
3.2. Serum Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	36
3.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) IgG Antikorlarının Araştırılması	36
3.3.1. BNV IgG Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Araştırılması	36
3.3.2. Batı Nil Virus IgG Pozitif Örneklerde IgG Aviditesinin Saptanması	40
3.4. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) IgG Antikor Varlığının Doğrulanması	41
3.4.1. İndirekt İmmünofloresan Antikor (IFA) Testi	42
3.4.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	44
3.5. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) ile Antijenik İlişkisi Olan Diğer Flaviviruslara Karşı IgG Antikorlarının Araştırılması	55
3.5.1. Donör serumlarında Dengue Virusuna (DENV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması	55
3.5.2. Donör serumlarında Kene Ensefaliti Virusuna (TBEV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması	56
3.5.3. Donör serumlarında Sarı Humma Virusuna (YFV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması	56
4. BULGULAR	57
4.1. Kan Donörlerinin Demografik Bulguları ve Risk Faktörleri	57
4.2. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) ELISA IgG Antikor Bulguları	59
4.2.1. BNV ELISA IgG Pozitifliği Saptanan Örneklerde IgG Avidite Testi Bulguları	61

4.2.2. BNV ELISA IgG Pozitifliği Saptanan Kan Donörlerinde Risk Faktörleri Varlığının Değerlendirilmesi	61
4.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virus (BNV) IgG Antikor Pozitifliği Doğrulama Testleri ile İlgili Bulgular	62
4.3.1. İndirekt İmmünofloresan Antikor (IFA) Testi Bulguları	63
4.3.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) Bulguları	65
4.4. Serum Örneklerinde BNV ile İlişkili Diğer Flaviviruslara Karşı IgG Antikorlarının Araştırılması ile İlgili Bulgular	68
4.4.1. DENV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular	68
4.4.2. TBEV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular	68
4.4.3. YFV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular	68
4.5. Çalışmada Elde Edilen Tüm Verilerin Birlikte Değerlendirilmesi	68
5. TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	91
EKLER	99
EK 1: Donör Formu	
EK 2: Aydınlatılmış Onam Formu	
EK 3: Kan Bağışçısı Bilgi Formu	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Aİ	Avidite indeksi
ALFV	Alfuy virus
BNV	Batı Nil virusu
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BSL-3	<i>Biosafety Level-3</i>
C	Kapsid (<i>Capsid</i>)
CCL5	Kemokin (C-C motifi) ligandı 5
CCR5	Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cf	Doğrulanmış (<i>Confirmed</i>)
CMC	Karboksi-metil-selüloz
CPCV	Cacipacore virus
CPE	Sitopatik etki
CTL	Sitotoksik T hücresi
CXCL10	C-X-C motifi kemokin 10
CXCR3	Kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3
ÇR	Çapraz reaktivite
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DC-SIGN-R	<i>DC-SIGN Receptor</i>
DD	Düşük duyarlılık
DEET	N,N-dietyl- <i>m</i> -toluamid
DENV	Dengue virusu
DH	Dendritik hücre
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E	Zarf (<i>Envelope</i>)
EDTA	Etilen Diamin Tetra-asetik asit disodyum tuzu

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplazmik retikulum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDS	Fötal dana serumu
HCl	Hidroklorik asit
HI	Hemaglütinasyon inhibisyon
HÜTF	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
IFA	İndirekt immünofloresan antikor
IFN	İnterferon
IFN- α	İnterferon-alfa
IFN (α/β)	İnterferon alfa/beta
IRF	<i>Interferon regulatory factor -3</i>
IRG	<i>IFN-regulated gene</i>
JAK/STAT	<i>Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
JEV	Japon ensefaliti virusu
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KOUV	Koutango virus
MAC-ELISA	IgM-Antibody Captured-ELISA
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MIF	Makrofaj inhibe edici faktör
MSS	Merkezi sinir sistemi
MVEV	Murray Valley ensefaliti virusu
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
NN Ab	<i>Non-Neutralizing Antibody</i>
NTPaz	RNA trifosfataz
OD	Optik dansite
ORF	<i>Open Reading Frame</i>

OAS	2'5'-oligoadenilat sentetaz
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline + Tween-20</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
Pfu/ml	Plak oluşturan ünite/mililitre
POD	Peroksidaz
prM	Membran öncülü
PRNT	Plak redüksiyon nötralizasyon testi
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RdRp	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction</i>
RU/ml	Relatif ünite/mililitre
SLE	St.Louis ensefaliti
SLEV	St. Louis ensefaliti virusu
SP	Streptomisin/penisilin
T/V	Tripsin/versen
TBE	Kene kaynaklı ensefalit (<i>Tick-borne encephalitis</i>)
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetra-metilbenzidin
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TS	Tampon solüsyonu
USUV	Usutu virus
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLP	<i>Virus-Like Particles</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YAOV	Yaounde virus
YF	Sarı humma (<i>Yellow fever</i>)

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Avrupa ve Akdeniz havzasında 1994-2006 yılları arasında Saptanan Batı Nil ateşi epidemi ve epizootikleri	4
2.2. Japon ensefaliti virus serokompleksi ve Batı Nil virusu suşları arasındaki filogenetik ilişki	5
2.3. Batı Nil virusunun A) Şematik yapısı B) Elektron mikroskopik görünümü	8
2.4. Batı Nil virusunun genomik yapısı ve proteinleri	8
2.5. Batı Nil virusunun replikasyon döngüsü	12
2.6. Batı Nil virusunun doğal yaşam döngüsü	13
2.7. 1999-2004 yılları arasında ABD’nde saptanan olgularda yaş ve cinsiyete göre Batı Nil virusu nöroinvazif hastalık insidansı	22
2.8. Batı Nil virusunun global dağılımı, 2003	23
2.9. Batı Nil virus enfeksiyonunda viral ve serolojik göstergeler	29
3.1. Batı Nil Virus IgG ELISA testinin uygulanması	39
3.2. Batı Nil Virus IgG ELISA testinde kullanılan kalibrasyon grafiği	40
3.3. Batı Nil Virus IgG tespitinde indirekt immüno Floresan testinin uygulanması	44
3.4. Hücre kültürü şişeleri ve hücre kültürü mikropiplakları	46
3.5. Laboratuvarımızda üretilen Batı Nil virusunun Vero hücre kültüründe oluşturduğu sitopatik etki	51
3.6. Plak redüksiyon nötralizasyon testinin uygulanması: A. Serum sulandırımının hazırlanması, B. Virus ile serum sulandırımının karıştırılması, C. PRNT plağının hazırlanması	54
3.7. PRNT sonuçlarının Değerlendirilmesinde İzlenen Metodoloji	55
4.1. Çalışmaya alınan kan donörlerinin cinsiyet dağılımı	58

4.2. BNV ELISA IgG pozitif örneklerde IgG avidite indeksi (%) değerlerinin dağılımı	62
4.3. BNV IgG IFA yönteminde pozitif ve negatif kontrol serumlarının görünümü	64
4.4. BNV IgG IFA yönteminde; A. Güçlü pozitif, B. Orta pozitif, C. Zayıf pozitif ve D. Negatif sonuç veren örneklerin görünümü	65
4.5. IFA yöntemi ile elde edilen BNV IgG değerlerinin dağılımı	66
4.6. Plak redüksiyon nötralizasyon testi ile BNV antikorları pozitif ve negatif olarak değerlendirilen örnek donör serumları	68

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Batı Nil virusu suşları ve filogenetik analizleri	6
3.1. Şekil 3.5'de PRNT testi sonuçları gösterilen serum örneklerinin değerlendirilmesi.	56
4.1. Kan donörlerinin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı	59
4.2. BNV kantitatif ELISA IgG sonuçları	60
4.3. BNV IgG antikor pozitifliği saptanan donörlerin demografik özellikleri, risk faktörleri ve ELISA IgG değerleri	61
4.4. Arboviral enfeksiyonlar açısından risk faktörü saptanan donörlerde BNV IgG antikor pozitifliği	63
4.5. Örneklerin ELISA BNV IgG ve IFA BNV IgG sonuçlarının karşılaştırılması	65
4.6. Örneklerde saptanan BNV ELISA IgG, IFA IgG ve PRNT sonuçları	67
4.7. BNV ELISA IgG, IFA IgG ve PRNT sonuçlarının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi	68
4.8. Örneklerde BNV, DENV, TBEV ve YFV antikorları için elde edilen niteliksel serolojik sonuçlar ve değerlendirme	70
4.9. Batı Nil virusu ELISA IgG pozitif donörlerin demografik özellikleri, risk faktörleri ve test sonuçları	71

GİRİŞ

İlk kez 1937 yılında tanımlanan Batı Nil virusu (BNV), *Flaviviridae* ailesi, *Flavivirus* cinsi ve Japon ensefaliti virusu (JEV) serokompleksi içerisinde yer alan, 45-50 nm büyüklüğünde, zarflı ve ikozahedral yapılı bir virustur. BNV'nun tek iplikli pozitif polariteli RNA genomu; kapsid (C), membran (prM/M) ve zarf (E) proteinleri olmak üzere üç yapısal ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) protein kodlamaktadır. Yapısal proteinler, olgun virionun yapısını oluştururken, yapısal olmayan proteinler viral transkripsiyon ve replikasyonu düzenlemekte ve konağın virusa karşı savunma mekanizmalarını zayıflatmaktadır (1-3).

Batı Nil virusunun doğal yaşam döngüsü, başta *Culex* türleri olmak üzere sivrisinekler ve kuşlar arasında gerçekleşir. BNV'nin insana bulaşmasında en önemli ve primer yol enfekte sivrisineklerin ısırmasıdır; ancak kan transfüzyonu, organ transplantasyonu, transplasental yol, anne sütü ve laboratuvarından kazanılan enfeksiyonlar da bildirilmiştir (3-5).

Batı Nil virusu ile doğal yolla oluşan (sivrisinek ısırığı) insan enfeksiyonlarında inkübasyon süresi ortalama 2-6 gündür. İnsanda BNV enfeksiyonları büyük oranda (%80) asemptomatik seyretmekte, enfekte olan kişilerin yaklaşık %20'sinde kendiliğinden iyileşen hafif ateşli hastalık (Batı Nil Ateşi) gelişmektedir. BNV enfeksiyonu olan hastalarda merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu ile ciddi hastalık gelişme oranı ise %1'den az oranda bildirilmektedir. Enfekte kişilerde, miyokardit, pankreatit ve fulminant hepatit gibi nörolojik olmayan diğer ciddi komplikasyonlar ise nadiren saptanmaktadır (2-4).

Batı Nil virus enfeksiyonlarının tanısı, klinik olarak hastalık belirtilerinin görülmesi ve özgül laboratuvar test sonuçlarının klinik ile uyumu sonucu konulur. Virolojik tanıda, kan veya beyin-omurilik sıvısında (BOS) BNV'na özgül antikorların veya viral nükleik asidin gösterilmesi esastır.

Klinik örnekten virus izolasyonu ise, viremi düzeyinin düşük ve kısa süreli olması nedeniyle genellikle başarılı olmamaktadır. (4-6).

Batı Nil virusu günümüzde Afrika, Orta Doğu, Asya, Avustralya, Avrupa ve Amerika'da birçok ülkede saptanmaktadır (7, 8). Coğrafi açıdan Türkiye, BNV salgınlarının olduğu ve insan/hayvan olgularının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakın ilişkili bir konumda yer almaktadır. Ayrıca ülkemizin gerek iklim özellikleri, gerekse vektör aktiviteleri, BNV'nun Türkiye'deki varlığı konusunda şüphe bırakmamaktadır. Ülkemizde BNV seropozitifliği ile ilgili veriler 30 yıldan uzun süredir bilinmekte ve her geçen gün yeni yayınlarla desteklenmektedir. Son olarak Ağustos 2010 tarihinde, Manisa ve çevresinde menenjit tablosu ile seyreden olguların ortaya çıkışı ve hastalardan üçünün ölümü ile de, bu virus ülkemizin gündemindeki yerini almıştır (<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-10898/eski2yeni.html>).

Türkiye'deki varlığının gösterilmesine karşın, BNV seroprevalansının bölgelerimize göre dağılımına ilişkin veriler sınırlıdır. Buna ek olarak, gerçek BNV seropozitifliğinin belirlenmesi için, çalışmalarda yaygın olarak kullanılan ELISA gibi hızlı serolojik testler ile alınan pozitif sonuçların, filaviviruslar arasında görülen çapraz reaksiyonlar nedeniyle doğrulanma zorunluluğu vardır. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörlerinde BNV seroprevalansının araştırılması ve elde edilen pozitif sonuçların altın standart bir yöntemle doğrulanmasıdır. Bölgemizdeki gerçek BNV seropozitifliğinin saptanması, hastalığın güncel durumu hakkında bilgi sağlanması, tıp ve sağlık çevresinde farkındalığın oluşturulması ve Türkiye'de BNV enfeksiyonlarının seroepidemiyolojik verilerine katkıda bulunulması açısından önem taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

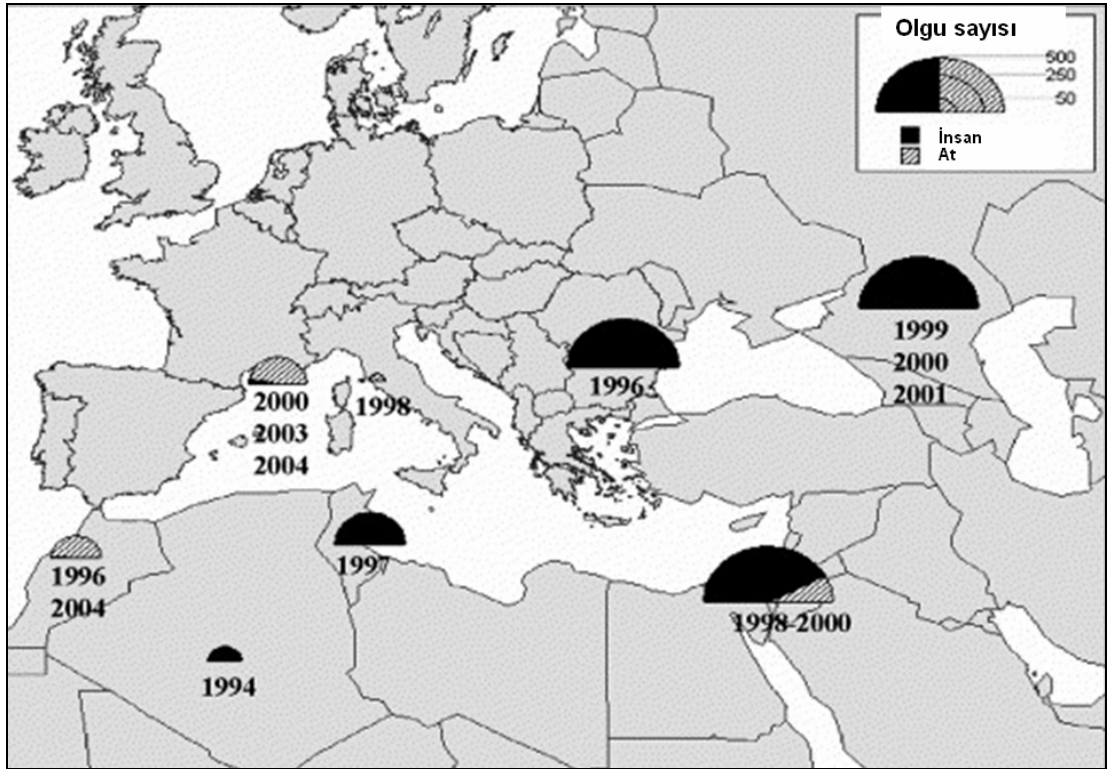
2.1. Tarihçe

Batı Nil virusu, ilk kez 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil bölgesinde, ateşi olan erişkin bir kadın hastanın kanından izole edilmiştir (1). 1940'lı yıllarda, bu virusun Japon ensefaliti virusu ile yakın ilişkili olduğu tespit edilmiş ve sivrisineklerle bulaşma özelliği, hem laboratuvar koşullarında hem de saha çalışmaları ile desteklenmiştir. Aynı yıllarda kuşların çoğaltıcı konak olarak rol oynadığı belirlenmiş, 1950'li yılların başında Mısır'da, sivrisinek, kuş ve insanlarda virusun varlığı gösterilmiştir (2). Kaydedilen ilk epidemi 1951-1954 ve 1957 yılında İsrail'de ortaya çıkmıştır. 1957'de İsrail'deki salgın sırasında BNV, yaşlı hastalarda meningoensefalit etkeni olarak tanımlanmış; 1960'lı yılların başında ilk kez atlarda hastalık oluşturduğu saptanmıştır. Avrupa'da ortaya çıkan epidemi ise 1962 yılında Fransa'nın Rhone bölgesinden bildirilmiş; bunu 1974 yılında Güney Afrika'da gerçekleşen kaydedilmiş en büyük epidemi izlemiştir (3).

1990'lı yılların ortalarına kadar endemik olduğu Afrika, Asya, Orta Doğu, Avrupa ve Avustralya gibi doğu yarımküre (Eski Dünya) bölgelerinde ateşli, grip benzeri, hafif klinik tablolarla seyreden sporadik enfeksiyonlar ve salgınlar oluşturan BNV; 1990'lı yılların ikinci yarısında daha sık ve daha ciddi epidemiler oluşturmaya başlamıştır. Meningoensefalit tablosunun ön plana çıktığı bu salgınlar, Romanya (1996), Fas (1996/2003), İtalya (1998), Rusya (1999) ve İsrail (1998-2000)'den bildirilmiştir (3-6) (Şekil 2.1). BNV'nun batı yarımküreye (Yeni Dünya) geçişi ise ilk kez 1999 yılında New York salgını ile gerçekleşmiştir (7). Ağustos 1999 tarihinde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin New York şehrinde, meningoensefalit ve flasid paralizi gelişen 59 olgunun ortaya çıkması üzerine yapılan epidemiyolojik ve çevresel analizler, artropod kaynaklı bir virusu (arbovirus) işaret etmiştir (7, 8). Bu salgının sorumlusunun önce St.Louis ensefaliti (SLE) virusu olduğu düşünülmüş; ancak aynı dönemde şehir içinde çok sayıda kuş ölümünün olması ve SLE virusunun kuşları enfekte etme özelliğinin olmaması, dikkatlerin başka bir

arbovirus üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) tarafından yapılan çalışmalarla, etken Batı Nil virusu olarak tanımlanmış ve bu suşun 1998 yılında İsrail'de dolaşan virus ile homolog olduğu belirlenmiştir (5, 8).

Batı Nil virusu, 2000-2001 yıllarında ABD'nin güney ve ortabati kısımlarına hızla yayılmış ve Haziran-Aralık 2002 tarihleri arasında, doğrulanan 4.156 BNV enfeksiyonu ve 284 ölüm ile, ABD tarihinde saptanan en büyük arboviral ensefalit salgınına yol açmıştır (3). Virusun, Kanada ve Kolombiya, Karayipler ve Meksika gibi Güney Amerika ülkelerine yayılımı ile Amerika kıtası da, BNV enfeksiyonları için endemik bölge haline gelmiştir. BNV'nun ilk olarak 1999 yılında ortaya çıktığı Kuzey Amerika kıtasına nasıl ulaştığı tam olarak bilinmemekle birlikte, New York'a uluslararası uçak yolculuğu yapan sivrisinekler, viremili kişiler ya da ithal edilen ekzotik kuşlar ile olduğu düşünülmektedir (3, 8).

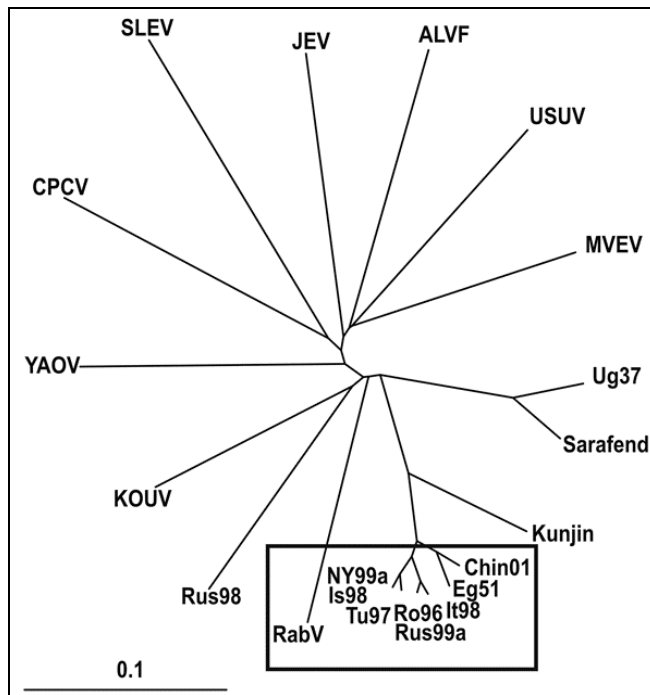


Şekil 2.1. Avrupa ve Akdeniz Havzasında 1994-2006 Yılları Arasında Saptanan Batı Nil Ateşi Epidemisi ve Epizootikleri (6)

2.2. Sınıflandırma

Batı Nil virusu, *Flaviviridae* ailesi, *Flavivirus* cinsi ve Japon ensefaliti virusu (JEV) serokompleksi içerisinde sınıflandırılmaktadır (9). *Flavivirus* cinsi; JEV serokompleksi viruslarının yanı sıra, sarı humma ve Denque gibi önemli insan patojenlerinin de yer aldığı yaklaşık 70 virustan oluşmaktadır. JEV serokompleksi içinde ise, BNV'ndan başka, JEV, St. Louis ensefaliti virusu (SLEV), Cacipacore virus (CPCV), Koutango virus (KOUV), Murray Valley ensefaliti virusu (MVEV), Alfuy virus (ALFV), Usutu virus (USUV), Yaounde virus (YAOV) ve Kunjin virus yer almaktadır (Şekil 2.2) (10). Özellikle Kunjin virus, BNV'nun antijenik ve genetik olarak ilişkili bir alt tipi olarak tanımlanmaktadır. Bu viruslar insanlarda, belirtisiz veya hafif grip benzeri enfeksiyonlardan, klinik ensefalite kadar değişen geniş bir spektrumda hastalık sendromlarına neden olabilmektedir.

Flavivirus cinsi içindeki viruslar arasında önemli düzeyde antijenik benzerlik mevcut olup, serolojik olarak yüksek oranda çapraz reaksiyon görülmektedir (11).



Şekil 2.2. Japon Ensefaliti Virus Serokompleksi ve Batı Nil Virusu Suşları Arasındaki Filogenetik İlişki (10)

2.2.1. Moleküler Epidemiyoloji

Batı Nil virusu, nükleik asit dizi analizi çalışmaları sonunda, nükleotid düzeyinde %30 oranında farklılık gösteren beş farklı genetik kökene (*lineage*) ayrılmaktadır (10, 12, 13). “Lineage-1” BNV suşları, Kuzey Amerika, Afrika, Orta Doğu, Asya ve Avustralya (Kunjin) izolatlarını; “Lineage-2” Sahra-altı Afrika izolatlarını; “Lineage-3”, Çek Cumhuriyeti’nde *Culex pipiens* sivrisinek izolatlarını (Rabensburg virus), “Lineage-4”, Rusya’nın Kafkasya bölgesinde *Dermacentor* türü kene izolatlarını; “Lineage-5” ise, Hindistan’a ait ayrı bir genotipi içermektedir (Tablo 2.1) (13). İzolatların filogenetik gruplandırması coğrafi dağılım ile ilişkili olmayıp, virusun yayılımında kuşların potansiyel önemini vurgulamaktadır.

Tablo 2.1. Batı Nil Virusu Suşları ve Filogenetik Analizleri (10)

İsim	Kod	Yıl	İzolasyon		Köken
			Konak	Bölge	
WNV HNY1999	NY99a	1999	İnsan	New York	1a
WNV NY99 flamingo38299	NY99b	1999	Flamingo	New York	1a
WNV IS98STD	Is98	1998	Leylek	İsrail	1a
WNV goose - Hungary/03	Hu03	2003	Kaz	Macaristan	1a
WNV Italy 1998 Equine	It98	1998	At	İtalya	1a
WNV RO9750	Ro96	1996	<i>Culex pipiens</i>	Romanya	1a
WNV VLG4	Rus99a	1999	İnsan	Volgograd, Rusya	1a
WNV LEIV-Vlg99	Rus99b	1999	İnsan	Volgograd, Rusya	1a
WNV PaH001	Tu97	1997	İnsan	Tunus	1a
WNV PaAn001	Fr00	2000	At	Fransa	1a
WNV Eg 101	Eg51	1951	İnsan	Mısır	1a
WNV Chin-01	Chin01	1950s	?	Rusya	1a
WNV Kunjin MRM61C	Kunjin	1960	<i>Cx. annulirostris</i>	Avustralya	1b
WNV Sarafend	Sarafend		Laboratuvar suşu		2
WNV B956 (WNFCG)	Ug37	1937	İnsan	Uganda	2
WNV goshawk- Hungary/04	Hu04	2004	Akbaba	Macaristan	2
Rabensburg virus (97-103)	RabV	1997	<i>Cx. pipiens</i>	Çek Cum.	3
WNV LEIV-Krnd88	Rus98	1998	<i>Dermacentor marginatus</i>	Kafkasya (Gürcistan?)	4

İnsan ensefaliti olgularının ortaya çıktığı bütün büyük salgınlardan “Lineage-1” BNV suşları sorumludur. “Lineage-2” izolatları ise insanda nöroinvazif yayılım özelliğine sahip değildir. Bu durum, virusun genetik yapısı ile klinik hastalık tipi arasında önemli bir ilişkili olduğunu göstermektedir (13).

Nükleotid dizi analizi çalışmaları, 1999 ve 2000 yılları arasında izole edilen Kuzey Amerika suşlarının, 1998 ve 2000 yıllarında izole edilen İsrail suşları ile neredeyse aynı olduğunu (%99.8 homoloji) ortaya koymuştur (14). Bu yakın ilişki, 1999 yılında New York şehrine taşınmış olan virusun, bir İsrail suşu olduğunu düşündürmektedir.

2.3. Virusun Yapısı ve Genomu

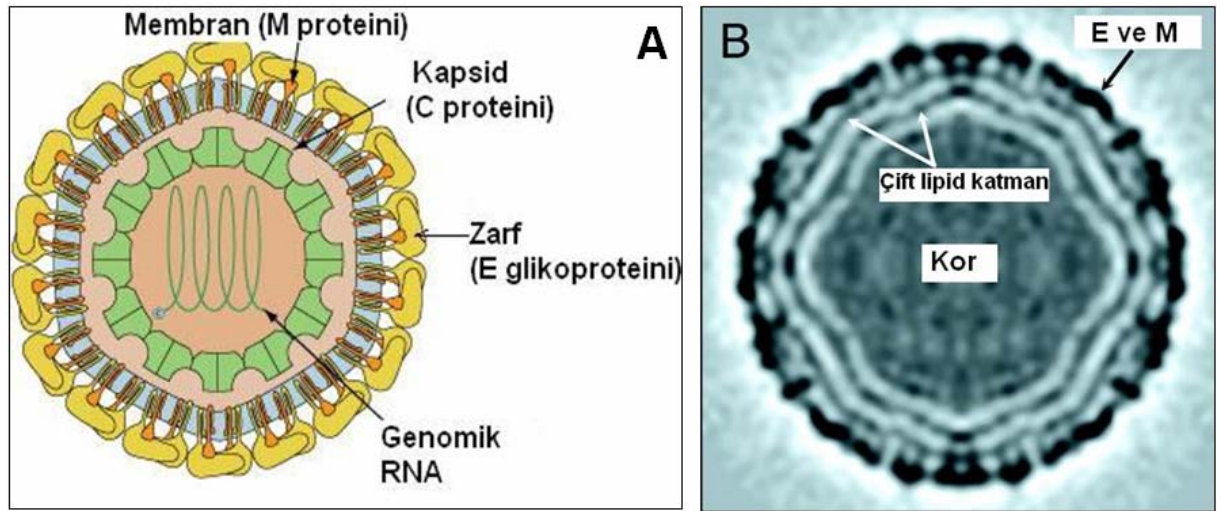
Batı Nil virusu, 45-50 nm büyüklüğünde, zarflı, ikozahedral nükleokapsidli, tek iplikli pozitif polariteli bir RNA virusudur (Şekil 2.3) (11). Viral zarf, E glikoproteini ve M proteini olmak üzere iki integral yapı içermektedir. Kriyo-elektron mikroskopik incelemede, zarf üzerinde çıkıntıların olmadığı dikkati çekmekte ve virusun farklı yoğunluklarda çok tabakalı bir yapıya sahip olduğu izlenmektedir. En yüksek yoğunluğa sahip olan dış tabaka E ve M transmembran proteinlerini içerirken, bunun altında çift katmanlı lipid tabaka ve en iç kısımda nükleokapsid kor kısmı yer alır (Şekil 2.3) (15).

Batı Nil virusunun genomu; lineer, tek iplikli, pozitif polariteli, yaklaşık 11 kilobaz (kb) büyüklüğünde RNA’dan oluşmaktadır. Genomik RNA, 5’ ve 3’ uçlarında protein kodlamayan (untranslated region, UTR) kısımlar ile tek bir uzun açık okuma çerçevesi (*Open Reading Frame*, ORF) taşımaktadır (Şekil 2.3) (16, 17). ORF tarafından kodlanan poliprotein, translasyondan sonra viral ve hücresel proteazlarla parçalanarak fonksiyon kazanan proteinleri oluşturmaktadır.

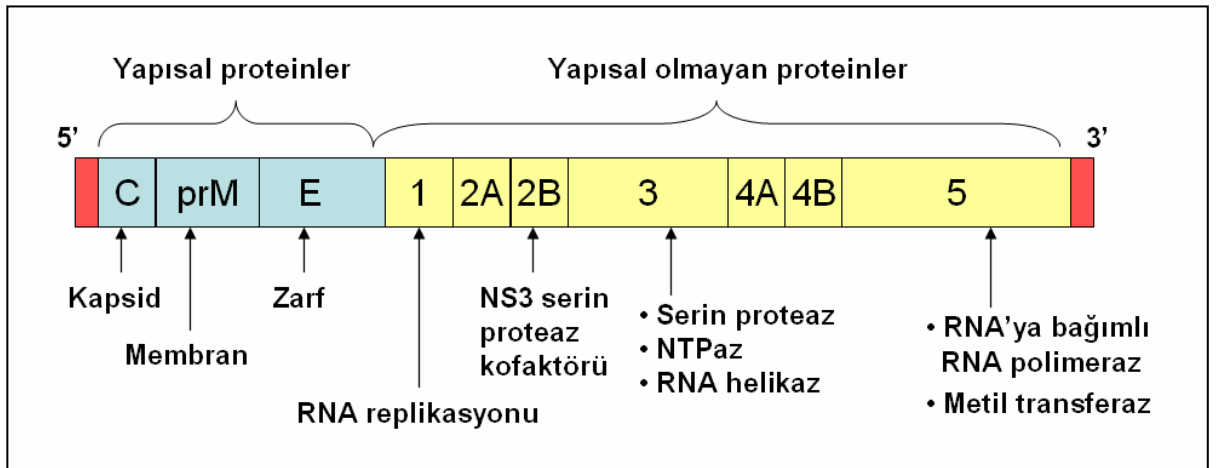
2.4. Viral Proteinler

Batı Nil virusunun RNA genomu; üç yapısal [kapsid (C), membran öncülü (prM) ve zarf (E)] ve 7 yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3,

NS4A, NS4B VE NS5) protein kodlamaktadır (Şekil 2.4) (16). Yapısal proteinler, olgun virionun yapısını oluştururken, yapısal olmayan proteinler viral transkripsiyon ve replikasyonu düzenlemekte ve konağın virusa karşı savunma mekanizmalarını zayıflatmaktadır.



Şekil 2.3. Batı Nil Virusunun A) Şematik yapısı, B) Elektron mikroskopik görünümü (http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html ve http://www.medscape.com/viewarticle/466976_3'den uyarlanmıştır)



Şekil 2.4. Batı Nil Virusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri (http://carnot.utmb.edu/flavitrack/images/flavivirus_genome.png'den uyarlanmıştır)

Majör yüzey proteini olan E proteini (53 kDa), zarf üzerinde homodimerler şeklinde dizilmiş olup her bir monomer üç kangaldan oluşmaktadır. Bu kangallar, hücre yüzeyi reseptörüne tutunma, hücre membranı ile füzyon ve konağın nötralizan antikor yanıtının indüklenmesinde rol oynar (15, 17). Merkezde bulunan birinci kanga N-glikozilasyon bölgesini taşıyan antijenik kangaldır. İkinci yapısal kangalın, endositik vezikül içinde pH'ya bağımlı füzyondan sorumlu olduğu; üçüncü yapısal kangalın ise reseptöre bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir (15, 18). Hemaglütinin özelliği de taşıyan E glikoproteini, virusa karşı oluşan nötralizan antikorların en önemli hedefidir.

Bir diğer yapısal protein olan M proteini, öncül protein (precursor M, prM; 18-20 kDa) olarak sentezlenir ve virus olgunlaşmasının geç döneminde bir konvertaz enzimi (furin) aracılığıyla M proteinine (8 kDa) dönüştürülerek olgun virion yapısına girer (9, 16).

Virusun C proteini (12 kDa), viral RNA'ya bağlı olarak bulunmakta ve nükleokapsidi oluşturmaktadır. Nükleokapsid kor yapısı, kapsid proteininin çok sayıda kopyasını ve RNA genomunu içermektedir (19).

Yapısal olmayan proteinler içinde en büyük yapıya sahip NS5 proteini, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimidir. NS5, aynı zamanda RNA "*cap*" oluşumunda görev yapan metiltransferaz aktivitesine de sahiptir (18, 19). NS3 proteininin N-terminal bölgesi, viral serin proteaz aktivitesi göstermekte ve bu aktivite için kofaktör olarak NS2B'ye gereksinim duymaktadır. NS3 proteini ayrıca, RNA "*capping*" olayında rol oynayan RNA trifosfataz (NTPaz) ve RNA helikaz aktivitelerine de sahiptir (Şekil 2.4). Yapısal olmayan diğer proteinler olan NS2A, NS4A ve NS4B, küçük hidrofobik proteinler olup, fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte, viral replikazın hücresel membranlara tutunmasını kolaylaştırdıkları düşünülmektedir (16, 17). NS2A, interferon (IFN) yanıtını inhibe eder ve viral ünitelerin bir araya toplanması sırasında rol oynar. NS1, NS2A'nın, sentez edildikten hemen sonra endoplazmik retikulumda (ER) bulunan bir konak proteinazı tarafından kesilmesiyle oluşur. Homodimerler oluşturan bir glikoprotein olan NS1, henüz

tam olarak açıklanamayan bir mekanizma ile hücre membranıyla etkileşim içindedir. NS1, sitoplazma dışında bulunmasına rağmen viral replikaz için gerekli bir kofaktördür (15). Enfekte hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen NS1'in, nötralizan olmayan antikor yanıtına yol açtığı düşünülmektedir (20). NS4A ve NS4B proteinleri de, hücrenin IFN- α/β sinyal yolağını değiştirerek, virusun, konağın antiviral etkisinden kaçışında rol oynamaktadır (21).

2.5. Virusun Replikasyonu

Replikasyonun ilk basamağı, virionun hücre yüzeyindeki özgül reseptöre tutunmasıdır. Son yıllarda yapılan in vitro çalışmalar, BNV'nun hücreye tutunmasında DC-SIGN, DC-SIGN-R ve integrin $\alpha_v\beta_3$ gibi dendritik hücre adezyon moleküllerinin reseptör olarak rol aldığını ortaya koymuştur (22, 23). Ancak, nöronlar gibi fizyolojik olarak önem taşıyan hücre tipleri için in vivo tutunma reseptörleri henüz tam olarak tanımlanamamıştır (21).

Hücre reseptörüne bağlandıktan sonra virus, hücre içersine reseptör aracılı, pH-bağımlı endositoz yoluyla alınır (11). Bu aşamayı, endozom içersindeki asidik ortamda endozomal vezikül membranı ile viral zarfın kaynaşması ve nükleokapsidin sitozole geçişi takip eder (Şekil 2.5). Pozitif tek iplikli genomik RNA, mRNA olarak görev yapar ve büyük tek molekül halinde bir poliprotein öncülü sentez edilir. Viral serin proteaz (NS2B-NS3) ve çeşitli hücre proteazları, bu poliproteine birden fazla bölgeden bağlanarak viral proteinleri keser ve fonksiyonel hale getirirler. Viral RNA polimeraz (NS5), diğer yapısal olmayan viral proteinlerin ve hücre proteinlerinin yardımıyla genomik pozitif iplikli RNA kalıbından, komplementer negatif iplikli RNA'yı kopyalar. Negatif polariteli bu RNA'lar, yeni genomik RNA'ların transkripsiyonu için kalıp görevi görmektedir. Flavivirusların RNA sentezi semikonservatif ve asimetriktir (16).

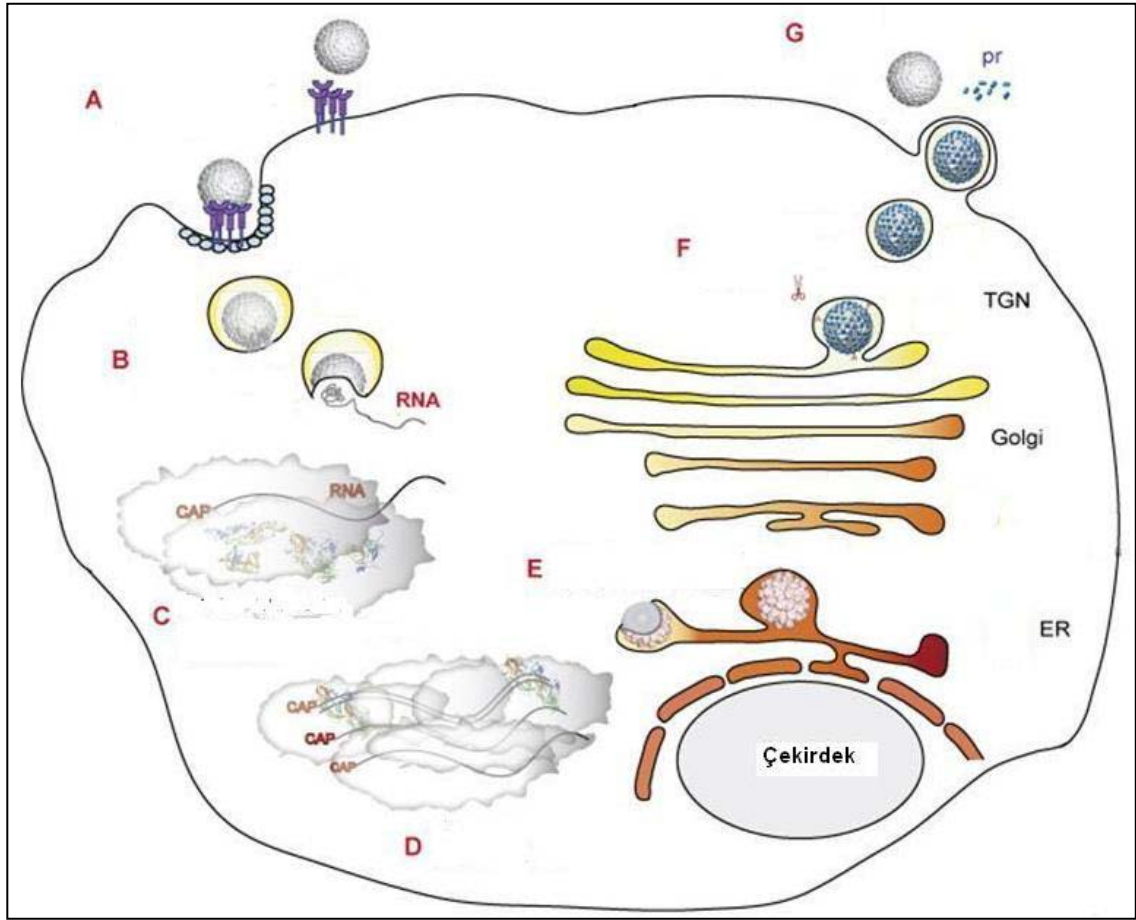
Batı Nil virusunun yeni sentezlenen kapsid proteinleri ile progeni RNA'ları endoplazmik retikulum (ER) membranlarında bir araya toplanmakta ve virion olgunlaşması hücrenin salgısal yolağında gerçekleşmektedir (21). ER membranında kapsid proteinleri ile viral genom paketlenir; nükleokapsid

ER lümeninden tomurcuklanırken prM ve E heterodimerlerini alarak olgunlaşmamış partikülleri oluşturur. Olgunlaşmamış partiküller veziküllerde birikirler ve daha sonra E ve prM üzerindeki glikanların farklılaştığı konak salgısal yolağına taşınırlar (21). Trans-Golgi ağından geçiş sırasında, düşük pH'nın da etkisiyle prM proteini hücresel furin ya da furin-benzeri proteazlar ile kesilir; prM proteininin kesimi ile pr peptidinin molekülden ayrılması, virus partikülünün yeniden düzenlenmesini ve olgunlaşmasını sağlar. Olgunlaşmış virionlar, vezikül içerisinde plazma membranına aktarılır ve ekzositoz yolu ile hücre dışına salınır (Şekil 2.5) (15, 18). Virusun hücreden çıkışında aktin filamentlerinin rol oynadığı gösterilmiştir (24).

BNV'nun hücre içindeki latent dönemi (4-6 saat), diğer flaviviruslarla karşılaştırıldığında (16-24 saat) oldukça kısadır. Enfeksiyondan 12 saat sonra progeni virionların enfekte hücrelerin sitoplazmik membranlarından yoğun olarak tomurcuklandığı gösterilmiştir (22).

Doğal BNV enfeksiyonu sırasında, hücre içinde olgun virionların yanı sıra enfeksiyöz olmayan virus-benzeri partiküller (*Virus-Like Particles*, VLP) de oluşmakta ve hücre dışına salınmaktadır (25). Bu partiküller; E, M ve bazen de prM proteinlerini içeren hücre membranlarından oluşurlar. Yapısal ve fizyokimyasal özellikleri olgun virus partikülüne oldukça benzer olan bu yapılar, konakta antijenik etki oluşturdıklarından rekombinant olarak hazırlanarak gerek aşı çalışmalarında gerekse serolojik testlerde antijen olarak kullanılmaktadırlar (25, 26).

Batı Nil virusu, in vitro olarak primer tavuk, ördek ve fare embriyo hücreleri, maymun, insan, domuz ve kobaylardan elde edilen devamlı hücre kültürlerinde üretilmekte ve hücrelerde küçülme, yuvarlaklaşma, nadiren de sinsitya oluşumu şeklinde sitopatik etki oluşturmaktadır (27).



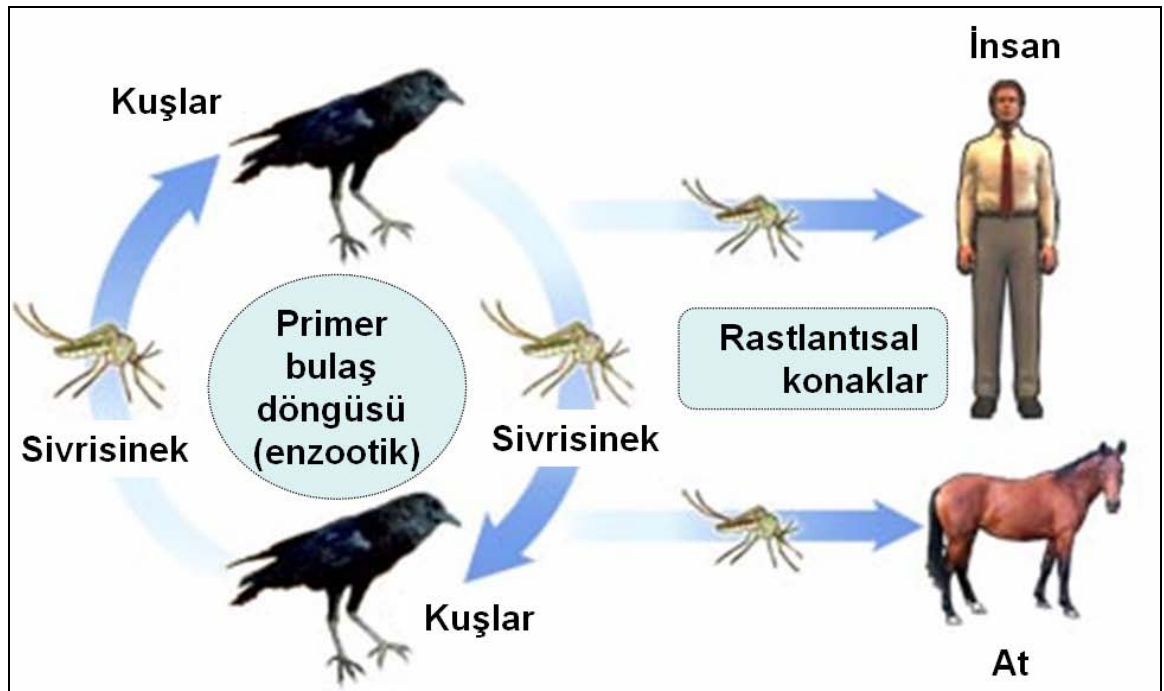
Şekil 2.5. Batı Nil Virusunun Replikasyon Döngüsü (18)

A) Virionun hücre yüzeyi reseptörüne tutunması ve endositoz ile hücreye giriş; B) Endozom içinde düşük pH ortamında viral glikoproteinler ile endozomal membranın füzyonu, genomik RNA'nın sitoplazmaya geçişi; C) Viral RNA'nın translasyonu ve oluşan büyük poliproteinin viral ve hücresel proteazlarla kesimi; D) Yapısal olmayan viral proteinlerin yardımıyla progeni RNA'ların transkripsiyonu; E) Endoplazmik retikulum (ER) membranında kapsid proteinleri ve progeni RNA'ların paketlenmesi, ER lümeninden E+prM heterodimerlerini içeren zarfı alarak tomurcuklanma; F) Olgunlaşmamış viral partiküllerin salgısal yolağa geçişi, trans-Golgi ağında (TGN) prM proteininin furin tarafından kesimi ve virionların olgunlaşması; G) Olgun virionların sitoplazmadan geçerek ekzositoz ile çıkışı.

(<http://jiang.bio.purdue.edu/images/flavivirus.jpg> 'den uyarlanmıştır)

2.6. Virusun Doğadaki Yaşam Döngüsü

Batı Nil virusunun doğadaki yaşam döngüsü, kuşlar ve ornitofilik sivrisinekler arasında (enzootik döngü) gerçekleşmektedir (Şekil 2.6) (5). Yabani kuşlar virusun primer konağı (rezervuar), sivrisinekler (*Culicidae*) ise virusun primer vektörüdür. Virusun doğadaki kalıcılığında daha ziyade *Passeriforme* takımında (ötücü kuşlar) yer alan kuşların (karga, kara tavuk, ispinoz, çalı bülbülü, serçe) rol oynadığı ifade edilmektedir; zira bu türlerde viremi son derece yüksek (10^9 pfu/ml) düzeyde ve uzun (7-8 gün) sürelidir. İnsanlar ve atlar ise, vireminin düşük ($\leq 10^3$ pfu/ml) ve kısa süreli (ortalama 3 gün) olması nedeniyle, virüsü sivrisineklere bulaştırmada çok etkin görünmemekte ve bu nedenle son konak (*dead-end host*) olarak kabul edilmektedir (3-5).



Şekil 2.6. Batı Nil Virusunun Doğadaki Yaşam Döngüsü (<http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM00836>'dan uyarlanmıştır)

ABD’nde yapılan çalışmalar, 146 kuş ve 29 sivrisinek türünün BNV ile enfekte olduğunu göstermiştir (4). Virus, Avrupa’da 4, Afrika ve Amerika’da ise 11 farklı cinse ait 43’den fazla sivrisinek türünden izole edilmiş olmakla birlikte, bulaştırıcılıkta en etkili trlerin *Culex* cinsine ait olduğu bildirilmektedir (28). BNV’nun ana vektörleri; Afrika ve Orta Doğu’da *Cx.univittatus*, Avrupa’da *Cx.pipiens*, *Cx.modestus* ve *Coquillettidia richiardi*, Asya’da ise *Cx.quinquefasciatus*, *Cx.tritaeniorhynchus* ve *Cx.vishnui* türleridir (3, 29).

Enfekte kuşlardan kan emerek virusu alan sivrisinekler, 10 gün ile 2 hafta arasında değişen bir inkübasyon döneminden sonra, virusu yaşam süreleri boyunca diğer bir kuşa veya insan dahil olmak üzere diğer omurgalılara bulaştırabilirler (28). Ilıman iklime sahip coğrafi bölgelerde, kuytu alanlarda kış ı geçirmeyi başaran sivrisinekler, sıcaklığın artışıyla birlikte aktivite kazanarak virusu bulaştırmaya devam edebilirler. Virusun, dolaşıma yeni girdiği bölgelerde doğal seyir, duyarlı kuşların ölümü ve takiben genel kuş popülasyonunda bağışıklığın gelişmesi şeklindeyir. İnsanlara bulaşın şiddeti ise, enfekte sivrisineklerin bolluğuna, beslenme düzenine ve yerel ekolojiye bağlıdır (29).

Batı Nil virusunun bulaşında kenelerin olası rolü ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, virus, yumuşak (*Argasidae*, *Argas* spp.) ve sert (*Ixodidae*, *Hyalomma* spp.) kenelerden izole edilmiş, buna karşın vektör olarak rolleri açıklık kazanmamıştır (29). Kenelerin endemik alanlarda virusun devamlılığında rol oynayabileceği, ancak epidemiler sırasında vektör olarak önem taşımadığı düşünülmektedir (30). Tatarcık türlerinin ise potansiyel vektör olabileceklerine dair bir veri mevcut değildir.

İnsanlar ve atların dışında BNV’nun izole edildiği ve virusa duyarlı olan diğer türler arasında yarası, tavşan, fare, sincap, kedi, köpek, sığır, keçi ve deve gibi hayvanlar yer almaktadır. BNV, kedi ve köpek gibi domestik hayvanları enfekte etse de, bu hayvanlarda klinik bir hastalığın ortaya çıkmadığı ve hayvandan insana bulaşın olmadığı belirtilmektedir (5). Ayrıca virusun, amfibi (rneğin, kurbağa) ve sürüngenlerde de (rneğin, timsah)

uzun süreli viremi oluşturduğu saptanmış; bu özellik nedeniyle, bu hayvanların BNV'nun kışı geçirmesinde barındırıcı konak olarak rol oynadığı düşünülmüştür (28, 29).

Kuşlar, BNV ile enfekte olduklarında genellikle herhangi bir semptom göstermezler. 1997 yılından önce BNV'nun kuşlar için patojen olmadığına düşünülmeye karşın, 1997-1998 döneminde İsrail'de, leylek ve diğer göçmen kuş türlerinin ölümüne neden olan daha virülan bir suş tanımlanmıştır (31, 32). Buna karşın, BNV enfeksiyonunun kuş ölümleriyle ilgisi, Avrupa'da 1999 yılında gerçekleşen salgınlara ve virusun New York'ta aniden ortaya çıkışına kadar anlaşılamamıştır. New York salgını sırasında binlerce kuş (özellikle karga türleri) telef olmuş, fatal insan ve at olguları bildirilmiştir (29).

Batı Nil virusunun neden olduğu hayvan enfeksiyonları en sık olarak atları (*Equidae*) etkilemektedir (33, 34). Atlara da sivrisinek ısırması ile bulaşan virus, insan enfeksiyonlarının seyrine benzer olarak, genellikle klinik bir hastalık oluşturmamakta; ancak bazen halsizlik, tremor, kısmi paralizi ve ekstremitelerinde zayıflık şeklinde belirtiler görülmektedir (33, 34). 2003 yılında 14.000'den fazla atta BNV enfeksiyonu saptandığı ve mortalite oranının yaklaşık %35-40 olduğu ifade edilmektedir (5).

2.7. Patogenez ve İmmün Yanıt

Batı Nil virusu, enfekte konaktan kan emen sivrisineklerin bağırsağından hemo-lenf sistemine geçerek iç organlara ve tükrük bezlerine yayılır (11). Tükrük bezlerinde virusu taşıyan sivrisinekler, diğer bir kan emme işlemi sırasında duyarlı insan veya hayvanlara virusu inoküle ederler. Periferik inokülasyonu takiben virusun ilk replikasyonu derinin Langerhans dendritik hücrelerinde gerçekleşir (35). Dendritik hücreler (DH) lenf nodlarına göç ederken, tip-I ve tip-II interferon (IFN) salgılayarak da virusun yayılmasını sınırlandırmaktadır. Virus, lenf bezlerinde makrofajlar, B hücreleri ve foliküler DH'de çoğalır; daha sonra afferent kanallara çıkar ve torasik kanal aracılığıyla dolaşıma geçerek viremi oluşturur. Viremi sırasında sinir sistemi

dışında birçok doku (karaciğer, böbrek, dalak) hematojen yolla enfekte olmakta ve virusun bu dokularda çoğalması vireminin devamını sağlamaktadır (35). Enfekte kişilerde viremi, hastalık semptomlarının ortaya çıkışından 2 gün önce başlar ve 4 gün sonraya kadar devam eder. Ancak virusun kandan izolasyon şansı, immün yanıtın virusu temizlemesi nedeniyle, semptomların başladığı ilk gün ciddi düzeyde azalmaktadır (2).

Lenf nodlarındaki DH ve makrofajlar, BNV RNA'sını hücre içinde endozom membranındaki Toll-benzeri reseptörler (TLR-3 ve TLR-7) ve sitoplazmadaki helikazlar [RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) ve MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*)] ile tanımaktadır (36). Bu tanıma sonucu, interferona bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile virusa karşı doğal immün yanıt başlar. IRF (*interferon regulatory factor*)-3 yolağının aktivasyonu ile oluşan tip-I IFN (α/β) yanıtı, en önemli doğal bağışıklık komponentidir (37-39). Yapılan in vivo çalışmalarda, IFN- α/β sinyal yolağında bir bozukluk olduğunda viral replikasyonun arttığı ve virusun doku tropizminin genişlediği saptanmıştır (40, 41). Benzer olarak, $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından üretilen tip-II IFN (γ) da, periferel viral replikasyonu sınırlandırır ve BNV'nun merkezi sinir sistemi (MSS)'ne yayılımını önler (41, 42). Çalışmalarda ayrıca, TLR3 ve 2'5'-oligoadenilat sentetaz (OAS) yolaklarının da, BNV enfeksiyonuna karşı doğal bağışıklıkta düzenleyici role sahip olduğu gösterilmiştir (41, 43).

Batı Nil virusunun MSS'ne yayılımı, enfeksiyöz virusun periferel dokulardan temizlenmesinden kısa bir süre önce gerçekleşir (35). Konağın immün yanıtından kaçarak MSS'ne ulaşan virus, serebral korteks, hipokampus, bazal ganglionlar, serebellum, beyin kökü ve omurilik gibi bölgelerde saptanmaktadır. MSS enfeksiyonu önce nöron hücrelerinde ortaya çıkar; zira beyin ve omurilikte virusun birincil hedefi nöronlardır (21). Bu hücrelerde dejenerasyon, yapı ve fonksiyon kaybı ile apoptoz görülür (41). IFN- α/β , MSS'nde enfeksiyonun kontrolünde de rol oynar ve nöronların sağkalımını artırır. CXCL10 ve CCL5 gibi kemokinler ve onların ligantları olan CXCR3 ve CCR5, CD4+ ve CD8+ T lenfositleri ile monositlerin MSS'ne girişini

kolaylaştırır ve böylece enfekte dokulardan virusun temizlenmesi gerçekleşir (21).

Virusun beyine girişi, vireminin en yüksek olduğu dönemde gerçekleştiğinden, MSS'ne yayılımın hematojen yol ile olduğu düşünülmüş, ancak daha sonraki çalışmalar kan-beyin engelini aşmada ek olarak bazı çözünür inflamatuvar faktörlerin de [Tümör nekrozis faktör (TNF)- α , makrofaj inhibe edici faktör (MIF)] rol oynadığını göstermiştir (41, 43, 44). Örneğin TNF- α , kan-beyin engeli geçirgenliğini değiştirerek virusun geçişini kolaylaştırmaktadır (21).

Virusun omuriliğe ulaşması ise özellikle retrograd nöronal transport ve aksonal yayılım ile olmaktadır (45). MSS'ndeki patolojik bulgular, doğrudan; (a) virusun nöron ve glia hücrelerindeki proliferasyonuna, (b) enfekte hücrelere karşı oluşan sitotoksik hücre yanıtına, (c) yaygın perivasküler inflamasyona ve (d) mikrogliyal nodül oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (2). Nodüller bol miktarda lenfosit (predominant olarak CD8+T) ve histiyosit içermekte olup genellikle nöronal dejenerasyonun yoğun olduğu bölgelerde saptanır. Perivasküler inflamasyon bölgelerinde ise B lenfositler predominant olarak görülmektedir. Meningoensefalitli hastalarda, klinik bulguların ortaya çıktığı anda, çoğu zaman antikor yanıtı başlamıştır (41). Hastaların %70-80'inde, hastalığın 8.gününde serum ve BOS'da IgM pozitifliği saptanır. BOS antikorları, viral replikasyonunun azaltılmasında önem taşırlar (36).

Batı Nil virusu enfeksiyonlarının eradikasyonu, virusa karşı oluşan kazanılmış immün yanıt tarafından gerçekleştirilir. Nötralizan antikor yanıtı büyük ölçüde virusun E proteinine karşı gelişmekle birlikte, prM/M ve NS1 proteinlerine karşı oluşan antikorların da koruyucu olduğu gösterilmiştir (41). Farelerde yapılan çalışmalarda, özgül IgM tipi nötralizan antikorların subkütanöz enfeksiyondan dört gün sonra ortaya çıktığı ve vireminin sınırlandırılması, virusun MSS'ne girişinin önlenmesi ve hastalığın gidişinin belirlenmesinde önemli olduğu saptanmıştır (46). Dolayısıyla, antikor yanıtının

düşük ya da eksik olduğu immün yetmezlik durumlarında, BNV enfeksiyonuna duyarlılık artmaktadır. Benzer olarak, C3 ve C4 kompleman komponentleri veya kompleman reseptörü 1 ve 2 eksikliği de, letal BNV enfeksiyonuna duyarlılığı artırmaktadır (47). Hücresel immün yanıtın önemi ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda da, CD4+T (Th) hücre eksikliğinde, B hücre uyarımı ve nötralizan antikor yanıtının azaldığı; sitotoksik T (CTL) hücre eksikliğinde ise viral yük ve MSS tutulumunun arttığı ve mortalitenin yükseldiği saptanmıştır (48, 49). MSS'nde CTL hücreleri, virusla enfekte nöronları perforin ve Fas ligand yoluyla öldürürken, Th hücreleri de bu yanıtın devamında rol alırlar. Kısaca, virusun periferde temizlenmesinden humoral yanıtın; MSS'nden uzaklaştırılmasında ise T hücrelerinin etkili olduğu söylenebilir (48).

Son yıllarda, BNV enfeksiyonlarının patogeneğinde konağa ait bazı faktörlerin de rolü olduğu gösterilmiştir. Bunlardan birisi; BNV ile enfekte nöronların temizlenmesinde rol alan lökositlerin beyne göçünü sağlayan CCR5 kemokini, diğeri ise IRG (*IFN-regulated gene*) ailesi üyesi olan ve viral RNA'yı parçalayan OAS'dır. Yapılan çalışmalarda, CCR5 ve OAS gen delesyonları ve/veya mutasyonları olan kişilerde, semptomatik BNV enfeksiyonlarına karşı yatkınlığın arttığı belirtilmektedir (50).

Batı Nil virusu, çeşitli mekanizmalarla doğal immün yanıttan kaçabilmektedir (51). Bu mekanizmalardan birisi, virusun RNA'sını saklayarak ya da maskeleyerek, viral RNA'yı tanıyan RIG-I ve MDA5 gibi hücresel tanıma reseptörlerinden (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) kaçması ve bu şekilde tip-I IFN indüksiyonunu geciktirerek replikasyon için zaman kazanmasıdır. Bir diğerk kaçış mekanizması da, yapısal olmayan viral proteinlerin IFN sinyal yolağını inhibe etmesi ya da değiştirmesidir. Örneğin NS2A proteininin, IFN-β gen transkripsiyonunu; NS1 proteininin ise, TLR3 sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (40, 50, 51). Ayrıca, patojenik "lineage 1" izolatları için karakteristik olmak üzere, NS4B proteinlerinin JAK/STAT sinyal yolunu değiştirerek tip-I IFN yanıtını bozduğu belirlenmiş, ancak bu mekanizma tam olarak açıklık kazanmamıştır (40, 52-54).

2.8. Klinik Bulgular

Batı Nil virusu enfeksiyonlarının inkübasyon süresi 2-15 gün arasında değişmekle birlikte ortalama 2-6 gündür (5). İnsanda BNV enfeksiyonları büyük oranda (%80) belirtisiz seyretmekte, enfekte olan kişilerin 1/5'inde (~%20) ise kendiliğinden iyileşen hafif ateşli hastalık gelişmektedir (9). Batı Nil ateşi olarak adlandırılan bu klinik tabloda sıklıkla, ani yükselen ateş, baş ağrısı, sırt ağrısı, miyalji, halsizlik, anoreksi, ve bulantı/kusma gibi genellikle 3-6 gün süren grip benzeri semptomlar görülür. Yaygın lenfadenopati sıklıkla rastlanılan bir diğer bulgudur. Hastaların yaklaşık yarısında ise, primer olarak yüz ve gövdede olmak üzere roseolar veya makülopapüler döküntü ortaya çıkmakta ve bir hafta kadar sürmektedir (5, 9).

Batı Nil virus enfeksiyonu olan hastalarda merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu ile ciddi hastalık gelişme oranı %1'den az oranda bildirilmektedir (55). Enfekte kişilerde, miyokardit, pankreatit ve fulminant hepatit gibi nörolojik olmayan diğer ciddi komplikasyonlar ise nadiren saptanmaktadır.

Merkezi sinir sistemi tutulumunun en sık görülen şekli meningoensefalit olmakla birlikte, tek başına menenjit veya ensefalit olgularına da rastlanmaktadır (5). Şiddetli olgularda hastalık; yüksek ateş, baş ağrısı, kas zayıflığı, ense sertliği, uyuşukluk, konfüzyon, koma, kas titremeleri, konvülsiyonlar şeklinde ilerler ve sonuçta paralizi ortaya çıkar (4). BNV'nun akut flask paraliziye neden olduğu iyi bilinmektedir (56). Poliyomiyelit benzeri sendroma yol açan bu klinik tabloda; kuvvet kaybı asimmetrik olup, harabiyet spinal anterior boynuz hücrelerinde sınırlıdır; duyu tutulumu görülmemektedir (56).

İsrail'de 2000 yılında saptanan 417 olgunun hastaneye yatırılan 233'ünde yüksek ateş %98.3, baş ağrısı %57.9, gastrointestinal semptomlar %18.5, koma %16.7 ve nörolojik semptomlar %9.4 olarak saptanmış; mortalite oranı %14.1 olarak belirlenmiş ve ölen hastaların %87.9'unun 70 ve üzeri yaş grubunda olduğu rapor edilmiştir (57). Yine 2000 yılında Amerika'da tanımlanan 19 BNV enfeksiyonu olgusunda; ateş %90, halsizlik

%63, baş ağrısı ve mental bozukluk %58, kas zayıflığı ve kusma/bulantı %42, miyalji, fotofobi ve ense sertliği %32, öksürük, diyare ve felçler %16, serebellar anomali ve kranial sinir felci ise %11 oranında saptanmıştır (58).

Nörolojik tutulumun olmadığı hastalarda tamamen iyileşme gözlenirken, MSS hastalığı olanlarda uzun süren morbidite ve %10'u aşan mortalite ortaya çıkmaktadır (5). 1999 New York salgınında ensefalitli hastaların sadece %35'i bir yıl içinde tam olarak iyileşebilmiş; diğerlerinde halsizlik, kronik baş ağrıları, bellek kaybı, yürüme güçlüğü, kas zayıflığı ve depresyon gibi çeşitli nörolojik bozukluklar gözlenmiştir (58). Salgınlar sırasında hastaneye yatırılan hastalarda olgu/ölüm oranları; Romanya'da (1996) %4, New York'ta (1999) %12 ve İsrail'de (2000) %14 olarak bildirilmektedir (7, 55). Bu oranlar 70 yaşından büyük hastalar için ise; Romanya'da %15 ve İsrail'de %29 olarak belirtilmiştir. New York salgını sırasında yapılan analizde, genç yaş grubu ile karşılaştırıldığında, 50-59 yaş grubunda ciddi nörolojik hastalık gelişme insidansı 10 kat, ≥80 yaş grubunda ise 43 kat yüksek bulunmuştur (7, 8). İleri yaşın yanı sıra, şiddetli kas zayıflığı, ensefalit ve bilinç değişimleri de kötü prognozun önemli klinik belirleyicileridir.

2.9. Epidemiyoloji

2.9.1. Bulaş Yolları

Batı Nil virusunun insana bulaşmasında en önemli ve primer yol enfekte sivrisineklerin ısırmasıdır. Virusu bulaştırmada en etkili türler *Culex* cinsine ait olup, *Cx.pipiens* birçok bölgede virusun enzootik döngüsünde rol oynamaktadır (Bkz. Kısım 2.5) (4, 8). Ilıman iklime sahip bölgelerde erişkin sivrisinekler, ilkbahar aylarının sonuna doğru ortaya çıkar ve sonbaharın ilk aylarına kadar dolaşımda kalırlar. Tropikal bölgelerde ise bulaştırıcılık yıl boyu devam etmektedir. Sivrisinek ısırığı ile enfekte olan rastlantısal konaklarda (insan, at) viremi düzeyi düşük olduğundan virusun amplifikasyonu yeterince gerçekleşmemektedir. Ancak ABD'nde 2002 epidemisi sırasında, virusun kan/kan ürünleri transfüzyonu, organ transplantasyonu, transplasental yol ve

anne sütü ile insandan insana bulaştığını gösteren kanıtlar elde edilmiştir (5, 9). Organ transplantasyonu ile geçişle ilgili rapor edilen ilk olgu, 2002 yılı Ağustos ayında organları dört alıcıya nakledilen bir vericidir (59, 60). Alıcıların hepsinde ateş, üçünde ise meningoensefalit gelişmiş ve bu alıcılarda BNV enfeksiyonu tanısı doğrulanmıştır. Ağustos 2002 - Ocak 2003 tarihleri arasında da, 14 enfeksiyöz vericiden kaynaklanan kan ürünleri (eritrosit, plazma ve trombosit) ile bulaşmış ve doğrulanmış 20 BNV olgusu bildirilmiştir (61). Bu veriler ışığında, 2003 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (*Food and Drug Administration*, FDA), bulaş riskinin yüksek olduğu mevsimlerde tüm kan bankalarında vericilerin BNV açısından klinik olarak taranmasını önermiş; ancak hastaların sadece %20'sinde semptomlar ortaya çıktığından, daha sonra tarama için nükleik asit testlerinin kullanılması gerektiğini vurgulamıştır (62).

Anne sütü ile geçişin gösterildiği olgu ise, doğumdan sonra 11. gün BNV meningoensefaliti tanısı konulan bir annedir (63). Bu olgunun süt örneğinde hem BNV IgM ve IgG hem de BNV-RNA pozitifliği tespit edilmiş; anne sütü alan bebeğin izleminde ise ateşinin olmadığı ve sağlıklı görüldüğü, ancak 25. günde serumunda BNV IgM'sinin pozitifleştiği saptanmıştır (63). Transplasental geçiş ile ilgili olgu ise, gebeliğinin 27. haftasında BNV meningoensefaliti tanısı alan bir hastadır. Doğum sonrası bu olgunun bebeğinde pozitif serolojik bulgular, bilateral koryoretinit, temporal ve oksipital loblarda bilateral beyaz madde kaybı belirlenmiştir (64).

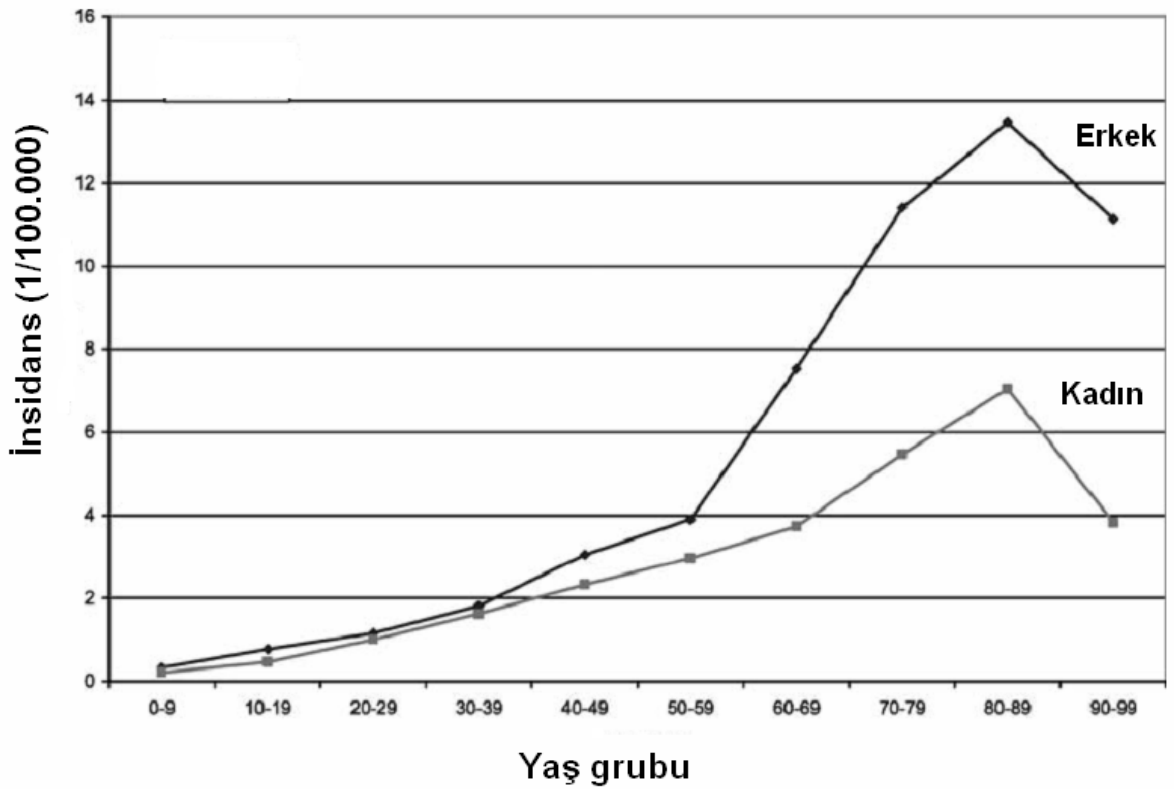
2002 yılında ayrıca, mesleksi olarak kazanılmış iki BNV enfeksiyonu da rapor edilmiştir. Bu olgular, BNV süveyansı için hayvan otopsisini yaparken perkütanöz olarak yaralanan laboratuvar personelidir. Her iki olguda da gelişen enfeksiyon hafif seyretmiş ve kendiliğinden tamamen iyileşmiştir (65).

2.9.2. Risk Grupları

İleri yaş, BNV enfeksiyonları sırasında ciddi nörolojik hastalığın gelişiminde en önemli risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.7) (5, 66). 50 yaş üzerindeki kişilerde MSS tutulumu riskinin yüksek olması, bu kişilerde

hipertansiyon gibi kan-beyin engelini bozan faktörlerin varlığına veya immün sistem fonksiyonlarının azalması nedeniyle viremi süresinin uzamasına bağlanmaktadır (5). BNV enfeksiyonları ayrıca, küçük çocuklar, immün sistemi baskılanmış hastalar (transplant ve kanser hastaları) ve diyabet gibi altta yatan hastalığı olanlarda daha ciddi semptomlar ile seyredebilmektedir (55-58).

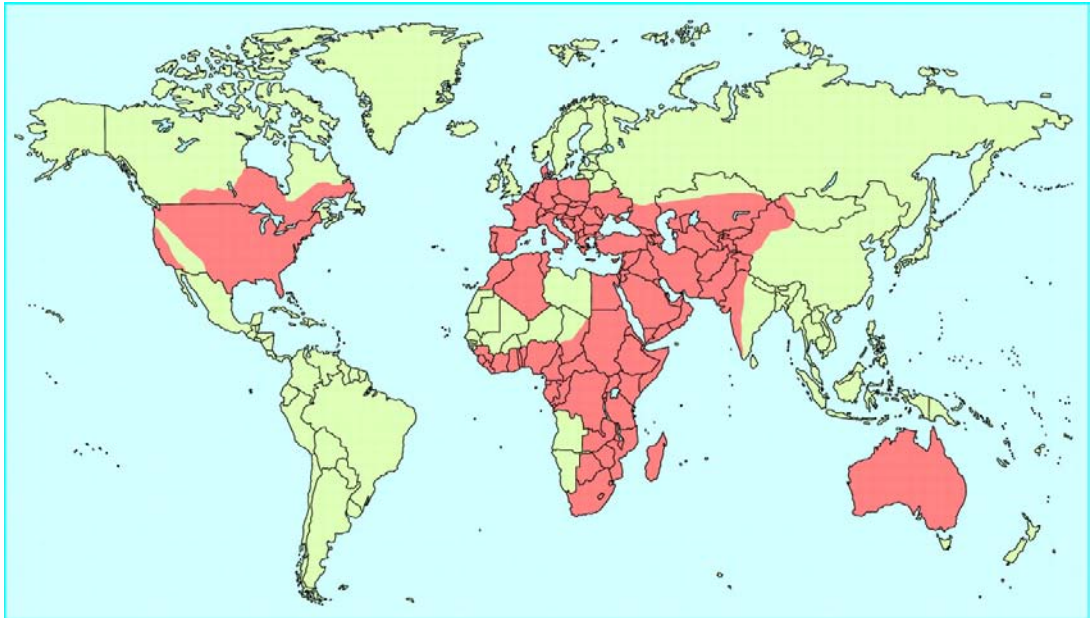
Son yıllarda sağlıklı genç erişkinlerde de nörolojik tutulumun olması, immün sistem yetmezliğinden bağımsız olarak, virusun virülansında bir artış olduğunu vurgulamaktadır (67). Nitekim ABD’nde klinik olarak tanımlanan olgularda da nöroinvazyon oranı %30-50, mortalite oranı ise %5-10 olarak bildirilmektedir (68).



Şekil 2.7. 1999-2004 Yılları Arasında ABD’nde Saptanan Olgularda Yaş ve Cinsiyete Göre Batı Nil Virusu Nöroinvazif Hastalık İnsidansı (66)

2.9.3. Coğrafi Dağılım

Arboviral enfeksiyonların coğrafi dağılımı; iklim ve bitki örtüsü gibi vektörlerin yaşam döngüsünü etkileyen koşullar, duyarlı insan/hayvan popülasyonlarının büyüklüğü, uluslararası seyahatler, kargo ve hayvan taşınması, insan kaynaklı çevresel değişiklikler ve doğal dengenin bozulması gibi çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir. BNV'nun da dünya üzerindeki dağılımına bakıldığında, Avrupa, Afrika, Asya ve Avusturalya'da endemik olarak bulunduğu görülmektedir (4, 13) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Batı Nil Virusunun Global Dağılımı, 2003 (4)

Endemik bölgelerde BNV, sporadik ateşli insan olgularının yanı sıra insan ve at popülasyonlarını etkileyen geniş salgınlara da yol açmaktadır. Güney Afrika'da ortaya çıkan salgınlara bakıldığında; 1994 yılında Cezayir'den (50 insan olgusu); 1996 ve 2003 yıllarında Fas'dan (sırasıyla, 94 ve 9 at olgusu) ve 1997 yılında Tunus'dan (173 insan olgusu) bildirimlerin yapıldığı izlenmektedir (69-71). Mısır'da da genel popülasyonda saptanan seroprevalans ortalama %24 olarak bildirilmektedir (72).

Doğu Avrupa'da, Romanya'nın Bükreş şehrinde 1996-97 yılları arasında görülen BNV salgını ise, yaklaşık 500 klinik olgu ve %10'a ulaşan ölüm oranı ile Avrupa'daki en büyük arboviral salgın olarak bildirilmiştir (73). 1999 yılında Rusya'nın Volgograd Bölgesi'nde ortaya çıkan büyük salgında da 800'den fazla kişi hastaneye yatırılmış (40 ölüm); 2005-2007 yılları arasında Rusya'nın farklı bölgelerinde de epidemiler gözlenmiştir (74, 75). Orta/Batı Avrupa'daki BNV aktivitesi incelendiğinde; İtalya'nın Toscana bölgesinde 1998 ve 2008 yıllarında; Fransa'nın güney bölgelerinde 1962-1965, 2000 ve 2003 yıllarında çeşitli büyüklüklerde insan ve at popülasyonlarını etkileyen salgınlar rapor edilmiştir (28, 76-79). Macaristan'da, 2003-2007 yılları arasında dört, 2008 yılında ise 14 BNV olgusu bildirilmiştir (80). Buna karşın ilginç olarak İngiltere'den BNV olgusu rapor edilmemiştir (81). Avrupa'da en yakın tarihli ve Türkiye'ye en yakın coğrafyada gerçekleşen salgın ise, Temmuz-Ağustos 2010 tarihinde, Yunanistan'dan bildirilen ve nöroinvazif 81 BNV olgusunun saptandığı salgındır. Olguların ortalama 70 yaşında olduğu bu salgında, ensefalit, menenjit ve meningoensefalit bulgularının özellikle 50 yaş üzerinde görüldüğü rapor edilmektedir (82).

Orta Doğu bölgesinde BNV salgınlarının en çok bildirildiği ülke İsrail olup, 1950 yılından bu yana BNV, İsrail'de gündemde kalmaya devam etmektedir (28, 31, 83). İsrail'de ortaya çıkan kayıtlı ilk salgın 1957, son salgın ise 2002 tarihli olup, popülasyonda saptanan genel seroprevalansın %27 oranında olduğu görülmektedir (3, 32).

Batı Nil virusu, Amerika kıtasına ilk kez Ağustos 1999 tarihinde ulaşmıştır. New York'ta ortaya çıkan bu salgında, çok sayıda kuş ölümü ile insan ve at ensefalit olguları tespit edilmiştir (3). Bu suşun (NY99), 1998 yılında İsrail'de dolaşan suş ile yüksek homoloji (%99.8) göstermesi, kaynağın İsrail olduğunu ve virusun kıtalararası yolculuk ile Yeni Dünyaya ulaştığını düşündürmektedir (8, 14, 83-85). Bu olasılıklar arasında; viremik kişilerin uçak ya da gemi ile New York'a seyahati, enfekte kuşların yasal ya da yasadışı yollarla Amerika'ya ithali ve sivrisineklerin farklı formlarının (yumurta, larva veya erişkin) kargoların içinde uçak/gemi ile Amerika'ya ulaşması

sayılabilir. Bu olasılıklardan ilki, insanda viremi süresinin kısa ve düzeyinin düşük olması nedeniyle fazla itibar görmemekte; diğer ikisi daha olası kabul edilmektedir (29, 84, 85).

Virusun ABD'nde yayılmasıyla, 2002 yılında 4.156 insan olgusu (284 ölü), 14.717 at olgusu (4.500 ölü) ve 13.000'den fazla kuş ölümü bildirilmiştir (28). Daha sonra BNV, Kanada ve Orta/Güney Amerika'ya da yayılmış ve 1999-2009 yılları arasında yaklaşık 29.600 insan (1.423 ölüm) ve 27.000'den fazla at (~9000 ölüm) olgusu ortaya çıkmıştır (3, 6, 28). ABD'ndeki BNV epidemisi sırasında, virusun, özellikle kuzgun ve karga gibi türlerde (*Corvidae*), daha önceleri dünyanın diğer bölgelerindeki salgınlarda rastlanmadığı ölçüde letal enfeksiyona yol açtığı izlenmiştir (8). BNV'nun virülansındaki bu artışın açıklanabilmesi için gen dizisi analizleri yapılmış ve NY99 izolatlarının kargalar için artan patogenezesinden, NS3 helikaz proteininde saptanan tek bir aminoasit (249. pozisyon) değişikliği sorumlu tutulmuştur (86). Bu mutasyonun (NS3-T249P), üç farklı yer ve zamanda ortaya çıktığı ve bu dönemlerde insan salgınlara da yol açtığı belirlenmiştir (13). Yüksek virülan bu suşlar (NY99), kuşlarda daha uzun süreli ve yüksek düzeyli viremi oluşturduğundan, kuşların sivrisinekler ve dolayısıyla da insanlar için kaynak teşkil etme rolleri de artmaktadır. 2002 yılındaki salgında ise NY99 suşu, yerini WN02 genotipine bırakmış ve bu tarihten sonra Kuzey Amerika'da WN02 suşu predominant hale gelmiştir (9). Bu genotip daha yüksek ısılarda NY99 suşundan çok daha hızlı yayılma özelliği göstermektedir. Bu durum da, virusun zarf proteininin (E) 159. aminoasidindeki mutasyon ile açıklanmıştır (50). Zira WN02 suşu, E159 mutasyonu sayesinde sivrisineklerde daha yüksek ısılarda daha fazla replike olabilmekte ve böylece kuşlara daha yüksek oranda bulaşabilmektedir.

2.9.4. Ülkemizdeki Durum

Batı Nil virusunun Eski Dünya bölgeleri arasında yayılımında, kuşların Avrupa, Asya, Afrika ve Orta Doğu'da gerçekleştirdiği göç olaylarının önemi büyüktür (29, 84). Sıcak hava termalleri sadece karalar üzerinde

oluştduğundan, göçmen kuşlar denizi geçmek zorunda kaldıklarında en dar geçişleri tercih etmektedirler. Bu nedenle, Avrupa ile Afrika arasında göç eden kuşlar, özellikle Cebelitarık ve İstanbul Boğazı'nda yoğunlaşmaktadır (3). Bu açıdan bakıldığında, kuşların başlıca yoğunlaştığı bölge olan İstanbul Boğazı, önemli bir risk altında bulunmaktadır. İstanbul'da yapılan bir çalışmada, şehrin farklı bölgelerinden toplanan sivrisinekler tür düzeyinde tanımlanmış ve bu türlerde BNV antijen varlığı araştırılmıştır (87). Çalışmada, en sık tanımlanan türlerin *Cx.pipiens*, *Cx.theileri* ve *Cx.torrentum* olduğu belirlenmiş, ancak yapılan testler sonucunda BNV antijen pozitifliği saptanmamıştır (87).

Coğrafi açıdan Türkiye, BNV salgınlarının olduğu ve insan/hayvan olgularının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakın ilişkili bir konumda yer almaktadır (Şekil 2.1). Hem Ortadoğu hem de Avrupa'da benzer iklim şartlarını paylaşan ülkelerde hastalığın görülmesi ve bu ülkeler ile aramızda turizm ve ticari ilişkilerin olması, BNV'nun Türkiye'de mevcudiyeti konusunda soru işaretleri bırakmamaktadır. Ülkemizde BNV olguları ile ilgili olarak ilk resmi açıklama, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından Ağustos 2010 tarihinde yapılmıştır (88). Oysa Türkiye'de, BNV enfeksiyonu varlığının ilk serolojik kanıtı 1970'li yılların ikinci yarısında gösterilmiştir (89). Güney Doğu Anadolu bölgesinde yapılan bu çalışmada, 937 kişinin serum örneğinde BNV seropozitifliği hemagglütinasyon inhibisyon (Hİ) yöntemiyle %42.8 gibi oldukça yüksek oranda bulunmuş, seropozitifliğin yaşla birlikte arttığı vurgulanmıştır (89). 1980 yılında Serter'in Ege bölgesinde yine Hİ yöntemiyle yaptığı çalışmada BNV seropozitifliği %29.1 oranında saptamıştır (90). 2006 yılında Özkul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, katırlarda %2.5, sığırlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, koyunlarda %1 ve insanlarda %20.4 oranında BNV seropozitifliği belirlenmiştir (91). Ergünay ve arkadaşlarının 2007 yılında Güney Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada, sağlıklı kişilerde IFA yöntemi ile %16 (29/181), plak redüksiyon nötralizasyon (PRNT) yöntemi ile %9.5 (17/179) oranında pozitiflik bulunmuştur (92). Hızel ve arkadaşları, Ankara'da Gazi Üniversitesi

Hastanesine başvuran 2.821 kan donöründe BNV seropozitifliğini ELISA yöntemi ile %2.4 olarak bildirmiş; ancak bu çalışmada seropozitiflikler nötralizasyon testi ile doğrulanmamıştır (93). Yine Orta Anadolu bölgesi kan donörlerinde yapılan bir çalışmada, 2.516 kişinin 25'inde (%1) BNV seropozitifliği saptanmış; sonuçlar nötralizasyon testi ile doğrulandığında bu oran %0.6 olarak belirlenmiştir (94). Bütün bu veriler, ülkemizde BNV aktivitesinin, düşük de olsa söz konusu olduğunu göstermektedir.

2.10. Tanı

Batı Nil virus enfeksiyonlarının tanısı, klinik olarak hastalık belirtilerinin görülmesi ve özgül laboratuvar test sonuçlarının klinik ile uyumu sonucu konulur (55). Virusun endemik olduğu bölgelerde, ilkbaharın son ayları ile sonbaharın ilk ayları arasında, ateşi ve açıklanamayan nörolojik bulguları, kas zayıflığı, eritematöz döküntüsü ve baş ağrısı olan hastalarda BNV enfeksiyonunun ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Bu amaçla, hastada, tam kan sayımı, BNV serolojisi ve BOS analizi (hücre sayımı, glukoz ve protein düzeyi) yapılması; gerektiğinde ise nörolojik görüntüleme yöntemlerinin (beyin manyetik rezonans) uygulanması önerilmektedir (8). CDC tarafından bildirilen klinik hasta tanımı; Batı Nil ateşi için ateş, baş ağrısı, halsizlik, deri döküntüsü (bazen), lenfadenopati (bazen), göz ağrısı (bazen) olup, ciddi hastalık (menenjit/ensefalit/poliyomiyelit) için bu bulgulara ek olarak, gastrointestinal semptomlar, ense sertliği, bilinç kaybı/mental bozukluk, letarji, konfüzyon veya koma, fokal nörolojik bozukluklar, asimetrik ekstremitte paralizi, miyelit, poliradikülit gibi bulgular olarak sıralanmaktadır (95).

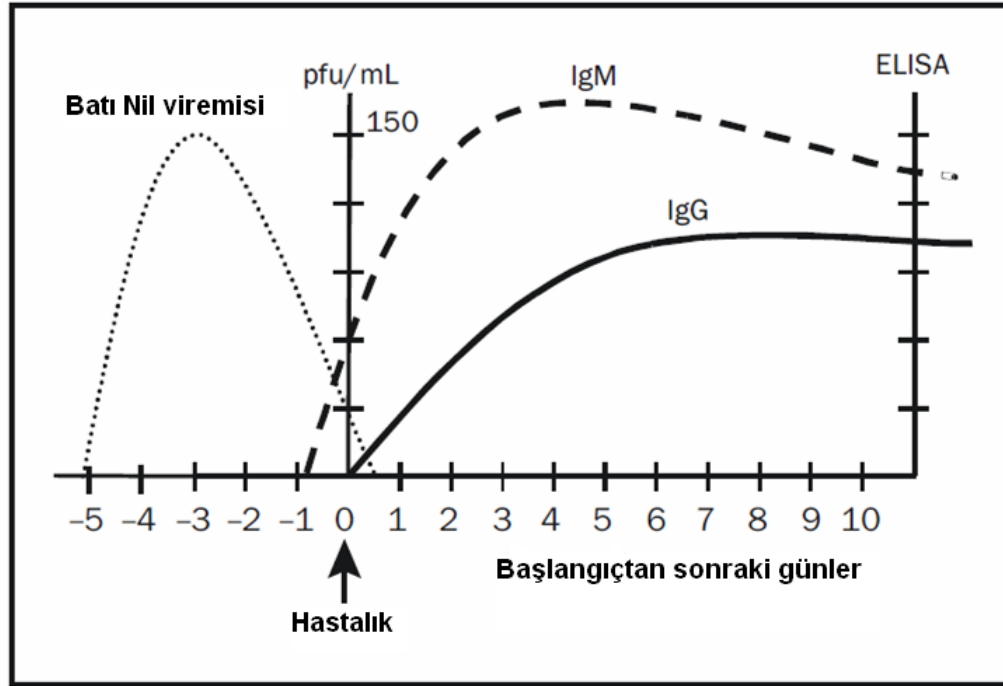
Ciddi hastalığı olanlarda, periferik kan total lökosit sayısı genellikle normal olmakla birlikte, hafif düzeyde lökositoz ya da lenfositopeni saptanabilir (95). Özellikle ensefalitli olgularda olmak üzere hiponatremi, tespit edilen bir laboratuvar bulgusudur (4, 5). Meningoensefalit gelişen hastaların beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları arasında ise; pleositoz (ortalama 30-100 hücre/ μ l, lenfosit predominansı), hafif-orta düzeyde protein artışı ve normal glukoz düzeyi saptanmaktadır (5, 95).

Enfeksiyonun doğrulanması, virolojik yöntemlere dayanır. Bu amaçla kan veya BOS'da BNV'na özgül antikorların veya viral RNA'nın gösterilmesi esastır (5, 96, 97). Klinik örnekten virus izolasyonu ise, viremi düzeyinin düşük ve kısa süreli olması nedeniyle genellikle başarılı olmamaktadır (Şekil 2.9) (4-6). Ancak yüksek düzeydeki viral yükün nörolojik tutulum için öngörü değerine sahip olması, duyarlılıkları düşük olsa da nükleik asit testlerinin önemlerini artırmaktadır (98, 99).

2.10.1. Serolojik testler

Batı Nil virus enfeksiyonu sırasında özgül IgM antikorları, hastalığın başlangıcından itibaren 2-8 gün içinde pozitifleşir, enfeksiyondan sonra 2 hafta yüksek düzeyde seyrederek ve birkaç hafta/ay içinde kaybolur (Şekil 2.9) (6, 9). Buna karşın birçok olgunun serumunda IgM antikorları, beklenen süreden daha fazla (≥ 1 yıl) kalıcı olabilir (6). Nöroinvazif hastalığı olanlarda ise IgM, MSS semptomları başladığı anda (genellikle 8.gün) serum ve BOS'da saptanmaktadır (100). Serum IgM pozitifliğinin, BNV ensefaliti geçiren ve iyileşen hastaların %36'sında 12 ay, %20'sinde ise 16 ay sonra devam ettiği, bazı hastalarda da BOS IgM düzeyinin 199 günden fazla saptanabilir olduğu ifade edilmektedir (101, 102). IgG antikorları ise, IgM'nin pozitifleşmesinden birkaç gün sonra, genellikle hastalık semptomlarının başlangıcından sonra 12. günde serumda saptanabilir düzeye ulaşmakta, üç hafta boyunca göreceli olarak yükselmekte ve uzun yıllar kalıcı olmaktadır (Şekil 2.9) (5, 6).

Batı Nil virus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında en etkin uygulama; klinik belirtilerin görülmesinden itibaren 8-14 gün içerisinde alınan serum veya 8 gün içerisinde alınan BOS örneğinde IgM antikorlarının saptanmasıdır (95). Bu amaçla, MAC-ELISA (IgM-*Antibody Captured*-ELISA) testi önerilmektedir (95). Bu yöntemin ticari olarak temin edilebilmesi, kolay uygulanabilmesi ve duyarlılığının yüksek olması (%95) gibi avantajları vardır (8).



Şekil 2.9. Batı Nil Virus Enfeksiyonunda Viral ve Serolojik Göstergeler (5)

IgM antikorları, kan-beyin engelini geçemediğinden, BOS örneğinde saptanan BNV IgM pozitifliği, MSS enfeksiyonunu kuvvetle doğrulamaktadır (95, 97). Ancak serumda saptanan BNV IgM pozitifliğinin yorumlanmasında dikkatli olunması gerekmektedir (8, 95, 103). Örneğin, klinik bulguların ortaya çıkışından sonra ilk 72 saatte yapılan test, IgM yanıtının kinetiği nedeniyle yalancı negatif sonuç verebilmektedir (8, 103). Ayrıca BNV IgM tespitinde, diğer akraba flaviviruslar (Japon ensefaliti, St.Louis ensefaliti, Dengue, sarı humma) ile çapraz reaksiyonlardan kaynaklanan yalancı pozitif sonuçların ortaya çıkabileceği de unutulmamalıdır (95, 96). BNV'na karşı oluşan IgM antikorlarının, serumda bir yıla kadar hatta daha uzun süre kalıcı olması nedeniyle, diğer birçok enfeksiyonun aksine, tek bir serum örneğinde saptanan IgM pozitifliği yeni geçirilen akut bir enfeksiyonu işaret etmeyebilir (5, 98). Dolayısıyla akut enfeksiyonun teyidi için, hastadan en az 14 gün arayla alınan çift serum örneğinin test edilmesi ve ≥ 4 kat serokonversiyonun gösterilmesi önerilmektedir (6, 95,99). BNV enfeksiyonunun doğrulanmasında CDC tarafından önerilen kriterler şu şekilde sıralanmaktadır (99):

- Doku, kan, BOS ve diğer vücut sıvılarından BNV'nun izolasyonu ya da bu örneklerde BNV antijenlerinin veya genom dizilerinin gösterilmesi.
- BOS örneğinde MAC-ELISA ile BNV IgM antikorlarının pozitif bulunması.
- Uygun zaman aralıkları ile alınmış (en az 14 gün) çift serum ve BOS örnekleri arasında BNV'na özgül nötralizan antikor titresinde en az 4 katı artışın plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile saptanması.
- Tek bir serum örneğinde, MAC-ELISA ile BNV'na karşı özgül IgM pozitifliği ile birlikte, ELISA ile pozitif saptanmış ve PRNT ile doğrulanmış IgG pozitifliği.

Batı Nil virusuna özgül antikor tespitinde kullanılan serolojik testler arasında, ELISA yönteminin yanı sıra indirekt immüno floresan antikor (IFA) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri de yer almaktadır (95, 99). Ancak, antijenik olarak birbiri ile ilişkili flaviviruslara karşı ELISA, IFA veya HI gibi yöntemlerle saptanan antikor pozitifliği, en özgül test olan plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile doğrulanmalıdır (5, 6, 8, 95, 99, 104).

Son yıllarda, BNV serolojik tanısında kullanılmak üzere “optik fiber immunoassay” ve “mikrosfer floresans immunoassay” gibi yöntemler de geliştirilmiştir (6).

2.10.2. Moleküler testler

Batı Nil virus enfeksiyonunun tanısında, kan, BOS ve dokularda viral RNA'nın saptanması amacıyla nükleik asit amplifikasyon testleri kullanılabilir (6, 9, 105, 106). Son yıllarda geliştirilen *TaqMan* sistemleri, klasik PCR yöntemlerine göre daha duyarlı sonuç vermekte ve daha iyi kantitasyon sağlamaktadır. Bu teknoloji insan serumu, beyin dokusu, sinek havuzları ve kanatlı dokularını içeren birçok örnekte BNV RNA'sının saptanması için kullanılabilir (105).

Kültür ile kıyaslandığında, moleküler yöntemler arasında en duyarlı olanların, gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nükleik asit dizi temelli amplifikasyon (NASBA) olduğu ifade

edilmekte ve bu yöntemlerin saptama düzeyinin ≥ 50 kopya/ml (yaklaşık 0.1 pfu/ml; hücre kültüründen 1000 kat daha duyarlı) olduğu belirtilmektedir (106). Yapılan bir çalışmada, serolojik olarak doğrulanmış BNV meningoensefaliti olan hastalarda RT-PCR (*TaqMan*) yönteminin BOS ve serum örneklerindeki duyarlılığı sırasıyla %57 ve %14 olarak bulunmuştur (105). Son yıllarda geliştirilen "*SYBR-Green*" temelli bir gerçek zamanlı RT-PCR yönteminin de, *TaqMan* yöntemine benzer duyarlılıkta olduğu; ancak BNV varyantlarını daha iyi tanımladığı ve daha ekonomik olduğu belirtilmektedir (6). Gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ayrıca, ABD'nde 2003 yılından beri uygulanan donör serumlarının taranması amacıyla da kullanılmaktadır (6).

2.10.3. Virus izolasyonu

Klinik örneklerden virusun izolasyonu, tanıda altın standarttır. Ancak nöroinvazif hastalığı olanlarda, nörolojik semptomlar başladığı sırada viremi düzeyi çok düşük ya da sonlanmış olduğundan virus izolasyonu nadiren başarılılabilmektedir (5, 6). Buna karşın, beyin ve diğer solid dokular gibi otopsi materyallerinden virus izolasyonu yapılabilir. Bu çalışmaların biogüvenlik düzeyi-3 (Biosafety Level-3, BSL-3) olan laboratuvarlarda yapılması önerilmektedir (95, 99).

Batı Nil virusu, devamlı hücre kültürlerinde (Örn. Vero, BHK-21) ve süt emen farelerde kolayca üretilir (11, 27). Hücre kültürlerinde sitopatik etkinin (CPE) saptanması halinde, özgül monoklonal antikorların kullanıldığı IFA veya RT-PCR yöntemleri ile virus üremesinin doğrulanması yapılmalıdır.

2.10.4. Antijen testleri

Batı Nil virusu antijen saptama testleri, Kuzey Amerika'da özellikle sivrisinekler (en az 50 adetlik sinek havuzlarında) ve ölen kuşlar (orofarinks veya kloak sürüntülerinde) için uygulanan süveyans programında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (6). Uygulaması kolay, ekonomik ve kısa sürede (15 dakika) sonuç veren bu testler (dipstick ve kaset testleri) ticari olarak temin edilebilmektedir. Bu yöntemlerin duyarlılığı düşük (%60-80) olmasına

rağmen, özgüllükleri oldukça yüksek (%95) oranda bildirilmektedir (6). CDC tarafından sinekler ve kuşlarda tarama amaçlı olarak kullanılan bir diğer antijen testi de, monoklonal antikorlar ile antijenin yakalanmasına dayanan bir ELISA yöntemi olup, bu yöntemin TaqMan yöntemine iyi bir alternatif oluşturduğu ifade edilmektedir (107). Buna karşın insan örneklerinin kullanıldığı antijen testleri mevcut değildir.

2.11. Tedavi

Batı Nil virus enfeksiyonunun özgül bir tedavisi olmayıp, semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanmaktadır (55). Bu amaçla, baş/kas ağrısının giderilmesi, ateşin düşürülmesi ve bulantı/kusmanın önlenmesi için analjezik, antipiretik ve antiemetik ilaçlar kullanılabilir (5, 8). Şiddetli kusma nedeniyle sıvı kaybının olması durumunda rehidratasyon, şiddetli kas zayıflaması durumunda ise entübasyon ve mekanik ventilasyon ile destek tedavisi yapılmalıdır.

Menenjit veya ensefalit gelişen hastaların hastaneye yatırılması ve tedavi edilebilir diğer MSS enfeksiyonlarının ayırıcı tanısının yapılması gereklidir (4). Ensefaliti veya paralizi olan hastalar, kafa içi basınç artışı olasılığına karşı gözlem altında tutulmalı, solunum yetmezliğinin gelişimi açısından da monitörize edilmelidir (5, 8, 9).

Yapılan çalışmalarda, ribavirin, alfa-interferon (IFN- α) ve pirazidin nükleozidleri gibi antiviral ajanların BNV'na karşı in vitro aktiviteleri gösterilmiştir (108, 109). Ayrıca bazı araştırmacılar IFN- α 2b ile meningoensefalitli olguların başarıyla tedavi edildiğini bildirmektedirler (110, 111). Ancak yine de bu ajanların in vivo kullanımı ile ilgili destekleyici kontrollü klinik veriler mevcut değildir.

Batı Nil virusuna özgül antikorları içeren intravenöz immünoglobulin uygulamasının da, BNV enfeksiyonlarında profilaktik ve terapötik etkinliğe sahip olduğu, farelerde yapılan çalışmalarla ortaya konmuş, salgınlar sırasında insanlarda yapılan hiperimmün gamaglobulin uygulaması da bu veriyi desteklemiştir (112-114).

Batı Nil virusunun ABD’nde yüksek nöroinvazif hastalık oluşturma oranı, son yıllarda yeni ve özgül antiviral ilaçların geliştirilmesi ile ilgili çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur (115). 2004 yılından itibaren yoğunlaşan bu çalışmalarda, özellikle virusun yapısal zarf proteinleri (prM ve E) ile NS3 (helikaz ve proteaz) ve NS5 (metiltransferaz ve RNA polimeraz) gibi yapısal olmayan proteinleri, ilaçlar için hedef alınmaktadır (18).

2.12. Korunma

Günümüzde bazı flavivirus enfeksiyonlarına (Sarı humma, Japon ensefaliti ve kene ensefaliti) karşı kullanılan onaylı aşılarda bulunmasına rağmen, BNV enfeksiyonlarına karşı korumada insanlar için henüz lisans almış bir aşı henüz mevcut değildir (116). Buna karşın, atların korunmasında kullanılan onaylı aşılarda ticari olarak temin edilebilmektedir (6). Bu aşılardan birisi, 2003 yılında lisans almış formalin ile inaktive tüm virus aşısı; diğeri ise 2004 yılında lisans almış rekombinant canlı *canarypox* virus aşısıdır (6). Her iki aşının da atlarda viremiye karşı %95-100 arasında koruyucu olduğu belirtilmektedir.

İnsanlar için kullanılmak amacıyla, inaktive tüm virus, rekombinant canlı virus, alt ünite ve DNA aşılarda üzerinde çalışılmaktadır (6, 116). Rekombinant aşılarda primer hedef, nötralizan antikorların uyarımında en önemli antijenler olan prM ve E yapısal proteinlerini kodlayan genleridir. Ayrıca yine prM/E alt ünitelerinden oluşan ve enfeksiyöz olmayan virus benzeri partiküllerin (*Virus Like Particles*, VLP) kullanımı ile ilgili aşı çalışmaları da yapılmaktadır (26). Ancak VLP alt ünite aşılarının en büyük dezavantajı, koruyucu immün yanıt oluşturmak için çok yüksek miktarlarda kullanılması gerekliliğidir.

Başarılı bir BNV aşısında arzulanan hedef, canlı atenüe aşılarda sağladığı gibi hem hümmoral hem de hüccresel immün yanıtın oluşturulmasıdır. Ancak duyarlı kişiler için risk oluşturabilmesi nedeniyle canlı BNV aşısı uygulanabilir görünmemektedir. Buna karşın canlı atenüe aşılarda olduğu gibi, in vivo olarak replike olabilen, kuvvetli nötralizan antikor yanıtı

oluşturabilen, viremiyi önleyebilen ve tek bir immünizasyon ile etkin korumayı sağlayabilen değişik genetik kökenli kimerik aşılar umut vaat etmektedir (6). Günümüzde iki kimerik BNV aşısı üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bunlardan birisi, uzun zamandır uygulanan ve güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmış sarı humma virusu (YFV) 17D aşısının vektör olarak kullanıldığı aşılardır (117). Bu teknolojiye, BNV yapısal protein genleri (WN-prM/E), YFV 17D aşısı suşunun karşılık gelen genlerinin (YF-prM/E) yerine yerleştirilmektedir. Bu aşılar şu anda faz I/II aşamasında olup başarılı sonuçların alındığı belirtilmektedir (117). Bir diğer canlı atenüe kimerik aşı ise, WN-prM/E genlerinin Dengue tip 4 virusuna entegrasyonu ile edilen aşı olup, faz I insan çalışmaları devam etmektedir (118).

Güvenilir ve etkili bir BNV aşısının eksikliği nedeniyle, bugün için en önemli korunma yolu sivrisinekler ile temasın önlenmesidir. Bu amaçla, bireysel düzeyde korunma önlemleri alınmalı ve toplumsal düzeyde sivrisinek kontrol yöntemleri uygulanmalıdır (5). Kişisel önlemler arasında; açık alan aktivitelerinden kaçınma, açık alan aktiviteleri sırasında kapalı giysilerin giyilmesi, ev veya tesis çevresinde sivrisinekler için yaşam alanı teşkil edecek koşulların (su/yağmur birikintileri, yalaklar, vb) yok edilmesi, yaşam alanlarında kapı ve pencerelerin kapalı tutulması ya da sineklik, cibinlik, vb. ile korunması ve DEET (N,N-dietil-*m*-toluamid) ya da permetrin içeren sinek kovucuların kullanılması gibi uygulamalar sayılabilir (5, 8). Toplum düzeyindeki önlemler ise, 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 (5, 115).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kan Donörleri

Çalışmaya alınan kan donörleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Kan Merkezi'ne 2009 yılı Nisan-Aralık ayları arasında kan bağışında bulunmak üzere başvuran kişilerden seçilmiştir.

Kan bağışında bulunmak üzere hastanemiz Kan Merkezi'ne başvuran tüm adaylar, Kan Merkezi'nde uygulanan standart protokol gereği "Donör Formu" (Ek 1) doldurmakta ve bu bilgilerin görevli sağlık personeli tarafından tek tek incelenmesiyle donör seçimi yapılmaktadır.

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın amaç ve içeriği ile ilgili olarak hazırlanan detaylı rapor, "Etik Kurul Başvuru Dosyası" halinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na sunulmuş ve 31.07.2008 tarih, HEK 08/150-25 sayı ile değerlendirilerek onay alınmıştır.

3.1.2. Çalışmaya Alınacak Donör Seçimi ve Bilgilendirilmesi

Hastanemiz Kan Merkezi'ne kan vermek üzere başvuran donörlere, başvuru sırasında uygulanan rutin protokolün yanı sıra etik kurallar gereği "Aydınlatılmış Onam Formu" (Ek 2) okunarak bilgilendirme yapılmış ve imzalanan formların birer kopyası katılımcılara verilmiştir. Ayrıca çalışmaya katılmayı kabul eden donörlere yaş, meslek, sürekli yaşanılan yer ve arboviral enfeksiyonlar açısından muhtemel risk faktörlerini belirleyici 9 sorudan oluşan "Kan Bağışçısı Bilgi Formu" (Ek 3) okunarak verilen cevaplar kaydedilmiştir.

Ankara ili nüfusunu sayısal olarak temsil edecek örneklem sayısı, HÜTF Biyoistatistik Anabilim Dalı'na danışılarak belirlenmiş ve buna göre çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden 400'ü kadın, 800'ü erkek olmak üzere toplam 1200 donör çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Serum Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Kan bankasında uygulanan standart tarama testleri sonucunda negatif bulunan donör kanları 10 dakika 4000x g'de santrifüj edilmiş ve serumları ayrılmıştır. Hemolizli ya da lipemik örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Serum örnekleri numaralandırılarak steril ependorflara, steril pipet uçları kullanılarak 2'şer ml'lik miktarlarda aktarılmış ve çalışma gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda (UltraLow Freezer, NuAire, ABD) saklanmıştır.

3.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) IgG Antikorlarının Araştırılması

Çalışmada, kan donörlerinden alınan serum örneklerinde BNV'na özgül IgG antikor varlığı, enzim temelli bir immünolojik yöntemle (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) araştırılmıştır. Taramada pozitif sonuç alınan örneklerle, BNV ile karşılaşma zamanının belirlenebilmesi için (yeni geçirilen ya da önceden geçirilmiş enfeksiyon) BNV IgG avidite testi uygulanmıştır.

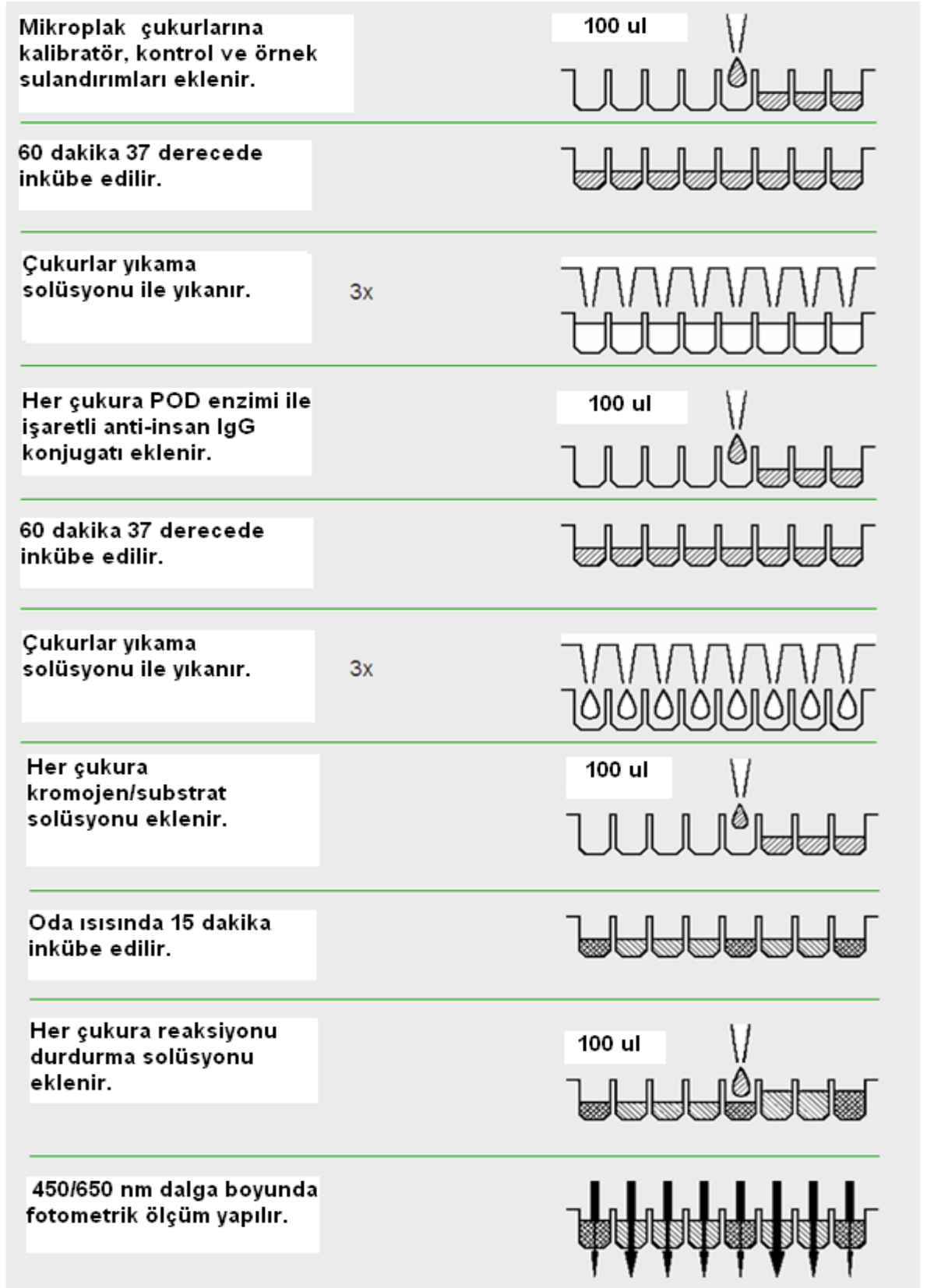
3.3.1. BNV IgG Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Serum örneklerinde BNV IgG antikorlarının taranması amacıyla, standardize edilmiş ticari bir ELISA kiti (Anti-West Nile Virus IgG ELISA; Euroimmun, Luebeck, Almanya) kullanılmıştır. Testin prensibi; BNV antijenleri (BNV ile enfekte hücre lizati) ile kaplı mikropalak çukurlarına serum örneklerinin eklenmesi ve özgül IgG varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin, ikinci bir antikor sistemi (enzimle işaretli anti-insan IgG konjugatı) kullanılarak saptanması esasına dayanmaktadır. Yöntemin uygulanması sırasında, özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla, her inkübasyon basamağı sonrası yıkama işlemi yapılmaktadır. Özgül bağlanmalar sonucu oluşan renk değişimi ise spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir.

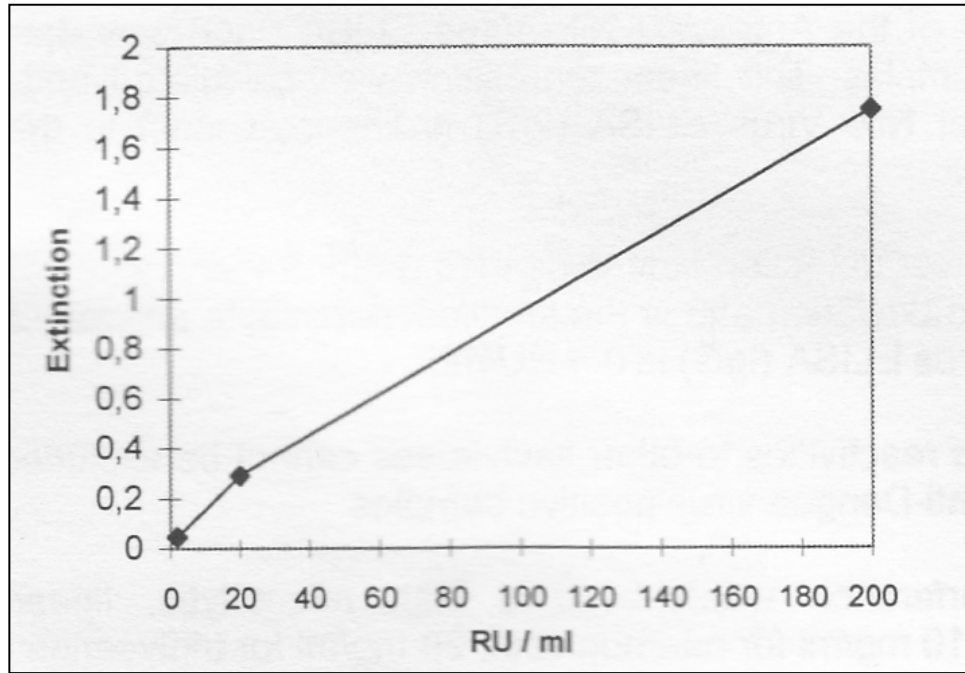
Çalışmada, BNV IgG ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda 96 çukurlu mikropleytler kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.1):

1. Teste başlamadan önce serum örnekleri, kit içinde hazır olarak bulunan tampon solüsyonu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Bu işlem için 10 µl serum örneği, 1.0 ml tampon solüsyonu içerisine eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı.
2. Mikroplak çukurlarına sırasıyla; kit içinde bulunan kalibratörler, kontroller ve yukarıdaki şekilde sulandırılmış serum örneklerinden otomatik pipet yardımıyla 100'er µl eklendi. Kit içerisinde, kantitatif değerlendirme yapılmasına olanak sağlayan farklı BNV antikor konsantrasyonlarında üç adet kalibratör [Kalibratör 1 (200 RU/ml), Kalibratör 2 (20 RU/ml), Kalibratör 3 (2 RU/ml)] ve testin kalite kontrolünün sağlanması için pozitif ve negatif kontroller yer almaktadır.
3. Mikroplakların üzeri koruyucu folyo ile kapatıldı ve 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.
4. Kit içinde 10X konsantrasyonda bulunan yıkama tampon solüsyonu, 9 birim distile suya 1 birim olacak şekilde eklenerek sulandırıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.
5. İnkübasyon sonunda mikroplak çukurları, yıkama tampon solüsyonuyla 3'er kez otomatik sistemde (ASYS Atlantis Washer, Euroimmun, Almanya) yıkandı.
6. Tüm çukurların üzerine 100'er µl peroksidaz (POD) enzimi ile işaretli anti-insan IgG solüsyonu (konjugat) eklendi; mikroplağın üzeri koruyucu folyo ile kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda mikroplak çukurları, yıkama tampon solüsyonuyla 3'er kez otomatik sistemde yıkandı ve tüm çukurlara 100'er µl kromojen-substrat solüsyonu [tetra-methylbenzidine (TMB)/H₂O₂] eklendi.
8. Mikroplak gün ışığı ile temas etmeyecek şekilde 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha sonra her bir çukura 100'er µl durdurma (stop) solüsyonu (0.5 M sülfürik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu.

9. Reaksiyonun sonlandırılmasından 15 dakika içinde, çukurlardaki renk değişiminin absorbans değerleri, referans dalga boyu 600-650 nm olmak üzere 450 nm'de spektrofotometrik olarak okutuldu.
10. Değerlendirmede, standartlara (Kalibratör 1, 2 ve 3) ait absorbans değerleri (optik dansite, OD) kullanılarak bilgisayar destekli (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, UK) bir grafik elde edildi (Şekil 3.2). Oluşan grafiğe göre örneklerin antikor konsantrasyonları, mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olacak şekilde kantitatif olarak belirlendi. Buna göre; antikor değeri ≥ 20 RU/ml olarak bulunan örnekler pozitif, 15-19 RU/ml arasında bulunanlar şüpheli pozitif (borderline), < 15 RU/ml bulunanlar ise negatif olarak kabul edildi. Üretici firma testin duyarlılığını %99.5, özgüllüğünü ise %96.9 olarak belirtmektedir.



Şekil 3.1. Batı Nil Virus IgG ELISA Testinin Uygulanması
(<http://www.euroimmun.com>'dan uyarlanmıştır)



Şekil 3.2. Batı Nil Virus IgG ELISA Testinde Kullanılan Kalibrasyon Grafiği (Euroimmun, Almanya)

3.3.2. Batı Nil Virus IgG Pozitif Örneklerde IgG Aviditesinin Saptanması

Çalışmada, ELISA testi ile BNV IgG pozitif bulunan donörlerin serum örneklerinde, virus ile karşılaşma zamanının öngörülebilmesi amacıyla BNV IgG avidite testi uygulanmıştır. Bir enfeksiyöz etkene karşı oluşan antikorlar, primer immün yanıt sırasında düşük aviditeye sahiptirler; bir diğer deyişle antijen ile bağlanma kuvvetleri düşüktür. Enfeksiyonun erken döneminde saptanan düşük aviditeli antikorlar, belirli bir süre sonra (≥ 4 ay) olgunlaşarak yerlerini yüksek aviditeli antikorlara bırakırlar. Dolayısıyla yüksek aviditeli IgG antikorları, etken ile karşılaşmanın yakın dönemde olmadığına göstergesi olup, önceden kazanılmış bağışıklığı ifade etmektedir (119).

IgG antikorlarının özgül antijeniyle bağlanma gücü, ELISA veya IFA temelli avidite testleriyle belirlenebilmektedir. Bu yöntemler “antijen-antikor bağlanması ve ayrılması” esasına dayanmaktadır. Antijen-antikor arasında oluşan bağlar zayıf ise (avidite düşük ise), üre gibi protein denatüre edici bir

ajanla muamele sonucu ayrışır. Buna karşın, aviditesi yüksek antikorlar üre solüsyonuna direnç gösterirler ve antijenle bağlarını koparmazlar. Çalışmamızda BNV IgG avidite testi, ticari bir kit (West Nile Virus Avidity Determination, ELISA, Euroimmun, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

Özgül antijenlerle kaplı mikropalak çukurlarına, yüksek ve düşük aviditeli kontrol serumları ile birlikte 1/101 oranında sulandırılmış donör serumları, her örnek için ikişer çukura olmak üzere 100'er µl pipetlendi. Mikroplağın üzeri koruyucu folyo ile kapatıldı ve 60 dakika 37⁰C'de inkübe edildi. Çukurlar otomatik yıkayıcı ile 3'er kez yıkama tampon solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra kontrol ve örneklerin ilk çukurlarına sulandırım tamponu, ikinci çukurlarına ise kit içerisinde hazır bulunan üre (6 M) solüsyonundan 200'er µl eklendi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Çukurlar tekrar 3'er kez yıkandı ve sonra üzerlerine 100'er µl konjugat solüsyonu eklendi. Mikroplağın üzeri koruyucu folyo ile kapatıldı; 60 dakika 37⁰C'de inkübe edildi ve çukurlar otomatik yıkayıcı ile tekrar yıkandı. 100'er µl kromojen substrat solüsyonu her bir çukura eklendi. Mikroplak, gün ışığıyla temas etmeyecek şekilde 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir çukura 100'er µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Çukurların absorbans değerleri (OD), 15 dakika içinde referans dalga boyu 600-650 nm olmak üzere 450 nm'de spektrofotometrik olarak okutuldu. Üre ile muamele edilmiş ve edilmemiş çukurlardaki örneklerin absorbans değerleri birbirlerine oranlanarak, IgG avidite indeksi (Aİ) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$Aİ (\%) = (\text{Üre ile muamele edilen çukurun absorbans değeri} / \text{Sulandırım tamponu ile muamele edilen çukurun absorbans değeri}) \times 100$$

Değerlendirmede, Aİ değeri <%40 olan serumlar düşük aviditeli, %40-60 olan serumlar sınırda aviditeli, >%60 olan serumlar ise yüksek aviditeli IgG pozitifliği olarak kabul edildi.

3.4. Serum Örneklerinde Batı Nil Virus (BNV) IgG 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 indirekt immüno Floresan antikor yöntemi ve altın standart olarak kabul edilen plak redüksiyon nötralizasyon testi ile yapılmıştır (6, 120).

3.4.1. İndirekt İmmüno Floresan Antikor (IFA) Testi

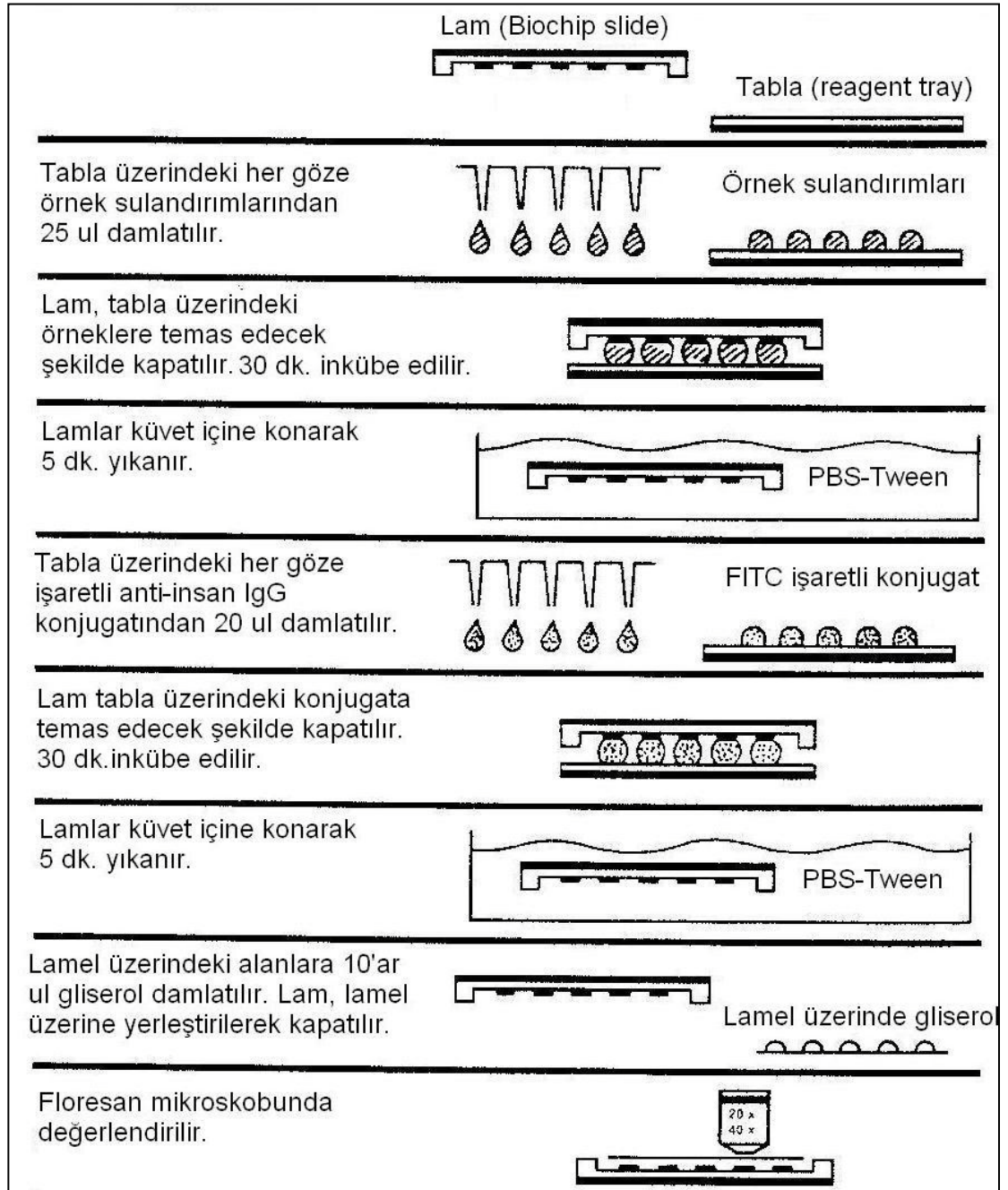
Çalışmada, BNV IgG pozitif/ şüpheli pozitif serum örneklerinin IFA ile doğrulanması amacıyla ticari bir kit (Anti-West Nile Virus IgG IIFT; Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır. Testin prensibi; lam üzerinde BNV ile enfekte hücrelerin fikse edildiği özel alanlara serum örneklerinin damlatılması ve özgül IgG varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin, ikinci bir antikor sistemi (floresanlı madde ile işaretli anti-insan IgG konjugatı) kullanılarak saptanması esasına dayanmaktadır. Yöntemin uygulanması sırasında, özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla, her inkübasyon basamağı sonrası yıkama işlemi yapılmaktadır. Özgül bağlanmalar sonucu oluşan parlak yeşil renkli floresans, epifloresan mikroskop ile değerlendirilmektedir.

Çalışmada, BNV IgG IFA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda firma tarafından temin edilen 10 gözlü özel tablalar (*Reagent tray*) ve BNV ile enfekte hücrelerin kaplandığı 10 gözlü özel lamalar (*Biochip slide*) kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.3):

1. Serum örnekleri, kit içinde hazır olarak bulunan tampon solüsyonu (TS) ile 1:100 oranında sulandırıldı. Bu amaçla önce serum örneklerinin 1/10'luk sulandırılmaları (11.1 µl serum + 100 µl TS) hazırlandı; daha sonra 1/10 sulandırılmış örneklerden tekrar 11.1'er µl alınarak 100 µl TS içerisine eklendi. Böylece örnekler 1/100 oranında sulandırılmış oldu.

2. Tablalar üzerindeki her bir alana sırasıyla; pozitif kontrol, negatif kontrol ve sulandırılmış donör serumları otomatik pipet yardımıyla 25'er µl damlatıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
3. Özel 10 gözlü lamalar, serum örneklerine tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi ve 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi.
4. Yıkama işleminde kullanılmak üzere PBS-T (Phosphate-buffered saline + Tween-20) solüsyonu hazırlandı. Bunun için kit içinde toz halinde bulunan PBS paketinin tamamı 1 L distile su içinde çözüldü ve yine kit içinde bulunan 2 ml Tween-20 eklenerek iyice karıştırıldı.
5. İnkübasyon sonunda lamalar, tablalar üzerinden alındı ve üzerlerinden hızlıca PBS-T solüsyonu geçirilerek yıkandı. Daha sonra içerisinde PBS-T solüsyonu olan küvet içine yerleştirilerek beş dakika bekletildi.
6. Temiz bir tabla üzerindeki her bir göze konjugat solüsyonundan (*fluorescein isothiocyanate* ile işaretli anti-insan IgG) 20'şer µl otomatik pipet yardımıyla damlatıldı.
7. Yıkama işlemi tamamlanmış lamalar, fazla sıvılarından arındırılarak konjugat ile tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi. Gün ışığı ile doğrudan temas etmeyecek şekilde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Yıkama işlemi yukarıdaki (Madde 5) şekilde tekrarlandı.
9. Kit içinde bulunan lamellerin üzerine, her alana birer damla (10 µl) olmak üzere kit içinde bulunan gliserolden damlatıldı. Daha sonra yıkama işlemi tamamlanmış ve fazla sıvılarından arındırılmış lamalar, bu lamellerin üzerine kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi (Şekil 3.3).
10. Değerlendirme, floresan mikroskopta (EUROStar II, Euroimmun, Almanya) 20X ve 40X büyütmede, BNV ile enfekte hücrelerin sitoplazmasında, özgül antijen-antikor birleşmesini ifade eden parlak yeşil renkli floresans veren küçük granüler yapıların görülmesiyle yapıldı. Örneklerde saptanan floresansın şiddeti; pozitif ve negatif

kontrollerle karşılaştırılarak zayıf (+), orta (++) veya güçlü (+++) pozitif şeklinde yorumlandı. Üretici firma testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %98 olarak belirtmektedir.



Şekil 3.3. Batı Nil Virus IgG Tespitinde İndirekt İmmünofloresan Testinin Uygulanması (<http://www.euroimmun.com>'dan uyarlanmıştır)

3.4.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

Çalışmada, BNV IgG pozitif/şüpheli pozitif serum örneklerinin doğrulanması için referans yöntem olarak kabul edilen PRNT, daha önceden tanımlandığı şekilde yapılmıştır (121, 122). Testin prensibi; serum örneklerinde BNV'na özgül antikor varlığında, virusun yüzey yapılarının bloke edilerek hücrelere girişinin ve üremesinin önlenmesi (nötralizasyon) ve bunun sonucu olarak hücre kültürlerinde virusun oluşturacağı sitopatik etki odaklarının (plak) azalması (redüksiyon) ya da hiç oluşmamasıdır (inhibisyon).

Virus Suşu

Referans BNV suşu (West Nile virus NY99-4132 strain), Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonundan sağlanmış ve laboratuvarımızda çoğaltılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Daha önceden plak yöntemi ile kantitasyonu yapılmış olan bu suş [3×10^5 plak oluşturan ünite (pfu)/ml], çalışmada, virus kontrol çukurunda 50-100 adet plak (gözle sayılabilecek kadar) oluşturmak üzere 1/300 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

Hücre Kültürleri

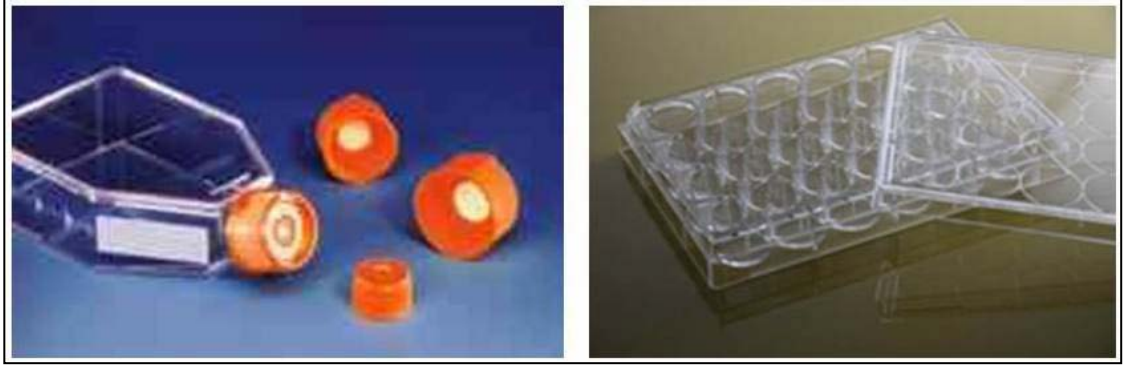
Batı Nil virusunun üretilmesi amacıyla kullanılan Vero (Afrika yeşil maymun böbrek) hücre kültürleri (ATCC CCL81), Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.

A. Hücre Kültürü Yönteminde Kullanılan Gereç ve Solüsyonlar

Vero hücre kültürlerinin pasajlarla çoğaltılması, idamesi ve dondurma/çözme işlemleri amacıyla kullanılan gereç ve solüsyonlar aşağıda verilmiştir (123).

a- Hücre kültürü şişeleri (Flask): Hücre kültürleri, ticari olarak temin edilen (Orange Scientific, İsviçre) 25 ve 75 cm² hacimli, kapakları filtreli özel polistiren şişeler içinde üretilmiş ve idame ettirilmiştir (Şekil 3.4).

b- Hücre kültürü mikropiplakları: PRNT uygulamasında kullanılan 24 çukurlu, düz tabanlı, steril mikropiplaklar, ticari olarak (Orange Scientific, İsviçre) temin edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücre kültürü şişeleri (solda) ve hücre kültürü mikropiplakları (sağda)

c- Dulbecco'nun modifiye üretim vasatı (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM): Hücre kültürlerinin üretilmesinde kullanılan DMEM besiyeri (Sigma-Aldrich, Almanya) esansiyel olmayan aminoasitler ve L-Glutamin içermektedir. Besiyeri pH'sı hidroklorik asit ile pH 7.2'ye ayarlanarak 0.22 µm çapındaki membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyon kontrolü yapıldıktan sonra besiyerleri +4°C'de saklanmıştır. Hücre kültürlerinde idame vasatı olarak, %10 fetal dana serumu ve %1 streptomisin/penisilin içeren DMEM kullanılmıştır.

d- Fetal dana serumu (FDS): Hücre üretim vasatına organik zenginleştirme amacıyla ilave edilen FDS, inaktive edilmiş olarak ticari bir firmadan (Biochrom, Almanya) sağlanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. FDS, hücrelerin üretilmesi ve idamesi amacıyla DMEM besiyerine %10, virus ekimi yapıldıktan sonra kullanılan DMEM besiyerine ise %2 oranında olacak şekilde eklenmiştir.

e- Streptomisin/penisilin (SP) solüsyonu: Ticari olarak temin edilen (Glaxo-Smith-Kline, İngiltere) SP (25000 U/ml penisilin ve 20 mg/ml streptomisin) solüsyonu, hücre kültürlerinde bakteriyel kontaminasyonu

engellemek için kullanılmıştır. Bu amaçla SP, DMEM besiyerine %1 oranında olacak şekilde eklenmiştir.

f- Tripsin solüsyonu: Proteolitik bir enzim olan tripsin, hücre pasajı sırasında, hücrelerin kültür şişesi yüzeyinden ayrılmasını sağlamaktadır. Tripsin solüsyonu; 4 gr sodyum klorür (NaCl), 0.1 gr potasyum klorür (KCl), 0.569 gr potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), 0.575 gr disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve 2.5 gr tripsinin 500 ml iyonuz suda eritilmesiyle hazırlanmış ve %0.2'lik fenol kırmızısı eklenerek, %8.4'lük sodyum bikarbonat ile pH 7.2'ye ayarlanmıştır. Bir gece +4°C'de bekletildikten sonra 0.22 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edilen süspansiyon, 100 ml'lik şişelerde kullanılıncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

g- Versen solüsyonu: Hücre pasajı sırasında tripsin ile birlikte kullanılan bir kelat ajanı olan versen (Etilen-diamin-tetraasetik asit disodyum tuzu, EDTA), hücrelerin yüzeyinden kalsiyum ve magnezyum iyonlarını ayırarak, tripsinin hücreler arasındaki peptid bağlarını parçalamasını kolaylaştırmaktadır. Versen solüsyonu; 4 gr NaCl, 0.1 gr KCl, 0.1 gr KH_2PO_4 , 0.72 gr Na_2HPO_4 ve 0.1 gr EDTA'nın 500 ml iyonuz suda eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 100 ml'lik şişelere bölündükten sonra otoklavda 120°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

h- Fenol kırmızısı (%0.2): Bir pH indikatörü olan fenol kırmızısı (0.4 g), 0.05 N sodyum hidroksit (NaOH) ile çözülmüş, solüsyonun son hacmi 200 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve pH 7.0'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

ı- Sodyum bikarbonat çözeltisi (%8.4): Hücre kültürlerinde kullanılan besiyeri ve diğer solüsyonların pH ayarlamasında kullanılan sodyum bikarbonat, 100 ml iyonuz suda 8.4 gr sodyum bikarbonat (NaHCO_3)'ın çözülmesi ile hazırlanmış ve 0.22 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

i- Hidroklorik Asit (HCl, 0.1 N): Hidroklorik asit, 100 ml iyonsuz suda 0.365 gr HCl'in çözülmesi ile hazırlanmış ve 0.22 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Hücre kültürlerinde kullanılan besiyeri ve diğer solüsyonların pH'larının ayarlanması amacıyla kullanılan HCl, +4°C'de saklanmıştır.

B. Hücre Kültürlerinin Pasajı ve İdamesi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü koleksiyonundan temin edilen Vero hücre kültürünün, tek tabaka (monolayer) haline geldikten sonra aşağıdaki yöntemle pasajları yapılarak devamı sağlanmıştır (123).

1. İşlemler sırasında kullanılacak olan besiyeri ve solüsyonların ısısı etüvde 37°C'ye getirildi. Tüm işlemler biyogüvenlik kabininde (Labgard 440 Class II Type A2 Biosafety Cabinet, NuAire, ABD) gerçekleştirildi.
2. Tek tabaka haline gelmiş hücrelerin içindeki besiyeri boşaltılarak tamamen ortamdan uzaklaştırıldı.
3. Hücrelerin üzerini örtecek şekilde tripsin eklendi (75 cm²'lik şişe için 3 ml) ve 30 saniye süre ile hücreler yıkandı. Daha sonra tripsin uzaklaştırıldı ve aynı işlem tripsin/versen (T/V, 1/1) solüsyonu ile iki kez daha tekrar edildi. Şişe içerisinde yaklaşık 1 ml T/V solüsyonu bırakılarak 37°C'lik etüvde 5-10 dakika inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin şişe yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi.
4. Hücreler, şişe yüzeyinden tamamen ayrıldıktan sonra üzerlerine 10 ml idame besiyeri eklenerek ince uçlu pipet (0.1 ml'lik) ile pipetaj (pipetle alıp hızla geri verme ve geri verirken şişe yüzeyine çarptırma) işlemi uygulandı.
5. Hücrelerin tek tek ayrılmış olduğu bu süspansiyon, steril kapaklı cam tüplere alınarak 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.
6. Üst sıvı atıldı ve hücreler tekrar 9 ml'lik aynı besiyeri ile pipetaj uygulanarak iyice karıştırıldı.
7. Üç adet boş steril hücre kültürü şişesine 17'er ml idame besiyeri konuldu ve üzerlerine 3'er ml hücre süspansiyonu dağıtıldı. Şişe

üzerlerine uygulamanın yapıldığı tarih ve yapılan pasaj sayısı kaydedildi.

8. Pasaj yapılan hücre kültürleri %5 CO₂'li etüvde 37°C'de tek tabaka oluncaya dek inkübe edildi. Hücreler her gün ters (inverted) mikroskopta (Leica DC 500, Almanya) izlenerek değerlendirildi. Gerektiğinde besiyerinin pH'sı ayarlandı.

C. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Vero hücre kültürleri, yedek olarak bulundurmak ve gerektiğinde kullanılmak amacıyla dondurularak saklanmış, belirli zaman aralıklarıyla çözülerek üreme kontrolleri yapılmıştır (123). Hücrelerin dondurulması için, tek tabaka halinde üretilmiş hücreler yukarıda bahsedildiği şekilde (Kısım B, Madde 2-5) şişe yüzeyinden tamamen ayrıldıktan ve santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış ve tüp içine 4.5 ml dondurma vasatı (%10 gliserol, %10 FDS ve %1 SP içeren DMEM) eklenmiştir. Pipetaj yapılarak iyice karıştırılan hücre süspansiyonu, -80°C ısıya dayanıklı kültür stok tüplerine 1.5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve üzerlerine hücrenin tipi, uygulamanın yapıldığı tarih ve yapılan pasaj sayısı kaydedilmiştir. Hücrelerin dondurulma işleminin kademeli olarak yapılması gerektiğinden, stok tüpleri sırasıyla; bir gece +4°C'de, ertesi gün dakikada 1°C soğuyacak şekilde -20°C'de tutulmuş, daha sonra -80°C'lik derin dondurucu (UltraLow Freezer, NuAire, ABD) içerisine kaldırılmıştır.

D. Hücrelerin Çözülmesi

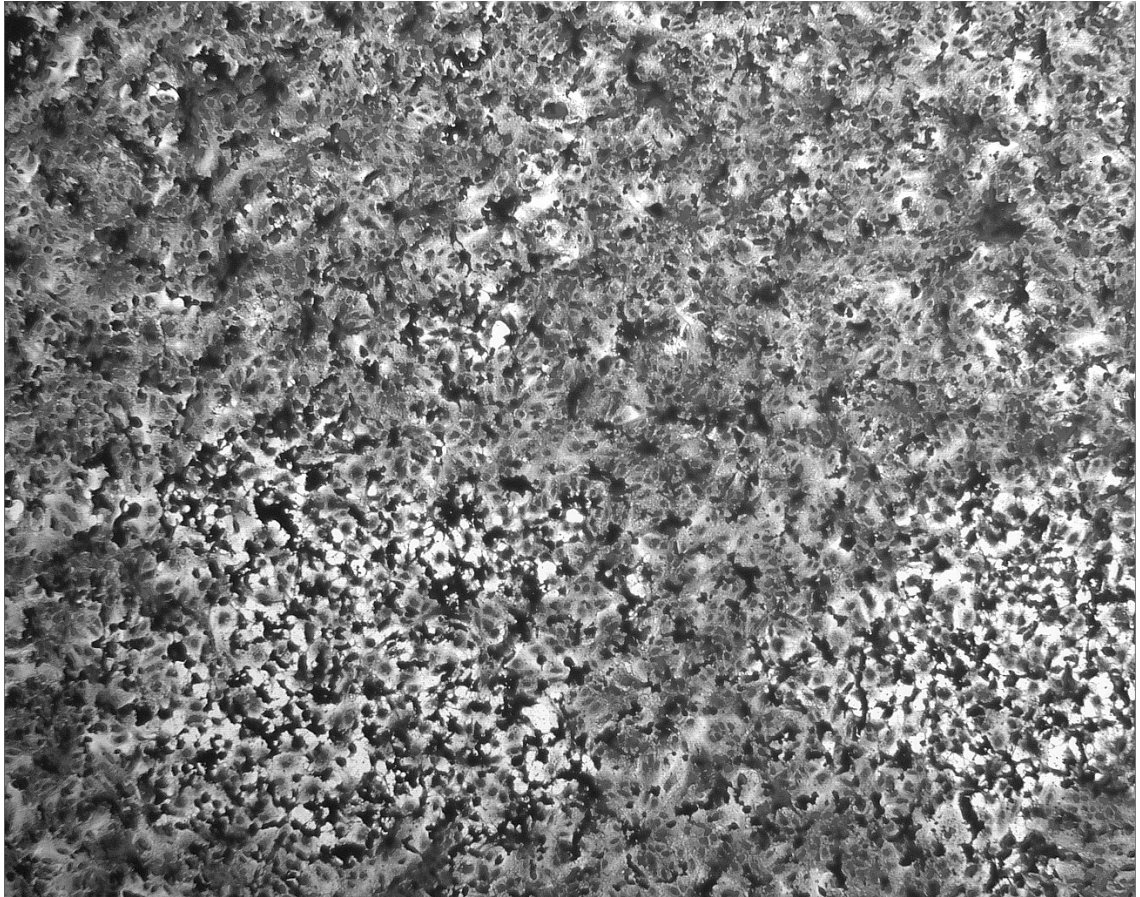
Hücrelerin çözülme işleminin hızlı yapılması gerektiğinden, çözülecek olan hücre stok tüpleri -80°C'lik dondurucudan alınır alınmaz derhal 37°C'lik etüve konulmuştur. Çözülen hücre süspansiyonunun üzerine 5 ml idame vasatı eklenerek pipetaj yapılmış ve santrifüj tüpüne alınarak 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst sıvı atılarak hücreler 20 ml üretme vasatı (%10 FDS ve %1 SP içeren DMEM) içeren şişe içine alınmış ve %5 CO₂'li etüvde 37°C'de tek tabaka oluncaya kadar inkübe edilmiştir (123).

E. Referans Virus Suşunun Çoğaltılması ve Saklanması

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı'ndan, ependorf tüp içerisinde 0.2 ml hacimde temin edilen ve -80°C'de dondurularak saklanan referans BNV suşu aşağıdaki yöntemle çoğaltılmıştır:

1. Derin dondurucudan çıkarılarak çözölen virus süspansiyonu üzerine, %10 FDS içeren DMEM vasatından 1.8 ml eklenerek sulandırım hazırlandı.
2. Önceden tek tabaka halinde üretilmiş Vero hücrelerinin bulunduğu 25 cm² hacimli şişenin içindeki besiyeri dökölerek uzaklaştırıldı. Şişenin içine 5-10 ml idame vasatı eklenerek hücreler 30 saniye süre ile yıkandı.
3. Yıkama işleminden sonra idame vasatı tamamen boşaltıldı. Virus süspansiyonunun tümü (2.0 ml) steril bir pipet ile hücre kültürü şişesi içine aktarıldı ve tüm hücre yüzeyine yayılması için rotasyon hareketi ile karıştırıldı.
4. Virus inokülasyonu yapılan hücre kültürü şişesi %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 2 saat inkübe edildi ve her 15-20 dakikada bir rotasyon hareketi tekrarlanarak virusun hücrelere adsorbe olması sağlandı.
5. Bu işlemi takiben, hücre kültürü şişesine %2 FDS ve %1 SP içeren DMEM vasatından 5 ml eklendi. Hücreler %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve günlük olarak izlendi.
6. İzlem sırasında; makroskopik (kontaminasyon ve pH değışimi kontrolü) ve mikroskopik (hücre morfolojisi ve sitopatik etki kontrolü) olarak inceleme yapıldı. Batı Nil virusu, Vero hücre kültüründe üretildiğinde, 3-4 gün içinde ortaya çıkan ve hücrelerde küçölme ve yuvarlaklaşma ile karakterize piknozis tipi sitopatik etki (CPE) oluşturmaktadır (27) (Şekil 3.5).
7. Hücrelerin %80-90'ında CPE'nin gözlemlendiği üçüncü gün sonunda, hücre kültürü şişesi -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Ertesi gün -80°C'den çıkarılan hücre kültürü oda sıcaklığında çözöldü ve böylece tüm hücreler şişe yüzeyinden kaldırılmış oldu.

8. Hücrelerin parçalanması ve hücre içindeki viral partiküllerin vasat içine geçmesini sağlamak amacıyla dondurma-çözme işlemi 2 kez daha tekrarlandı.
9. Hücre süspansiyonu, ince uçlu bir pipet (0.1 ml'lik) ile pipetaj yapılarak iyice homojenize edildi ve steril bir santrifüj tüpüne alınarak 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj işleminden sonra virusun bulunduğu üst sıvı alındı ve ısıya dayanıklı stok tüplerine 1'er ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüplerin üzerine hücre tipi, virus suşu ve uygulama tarihi kaydedilerek -80°C'de saklandı.



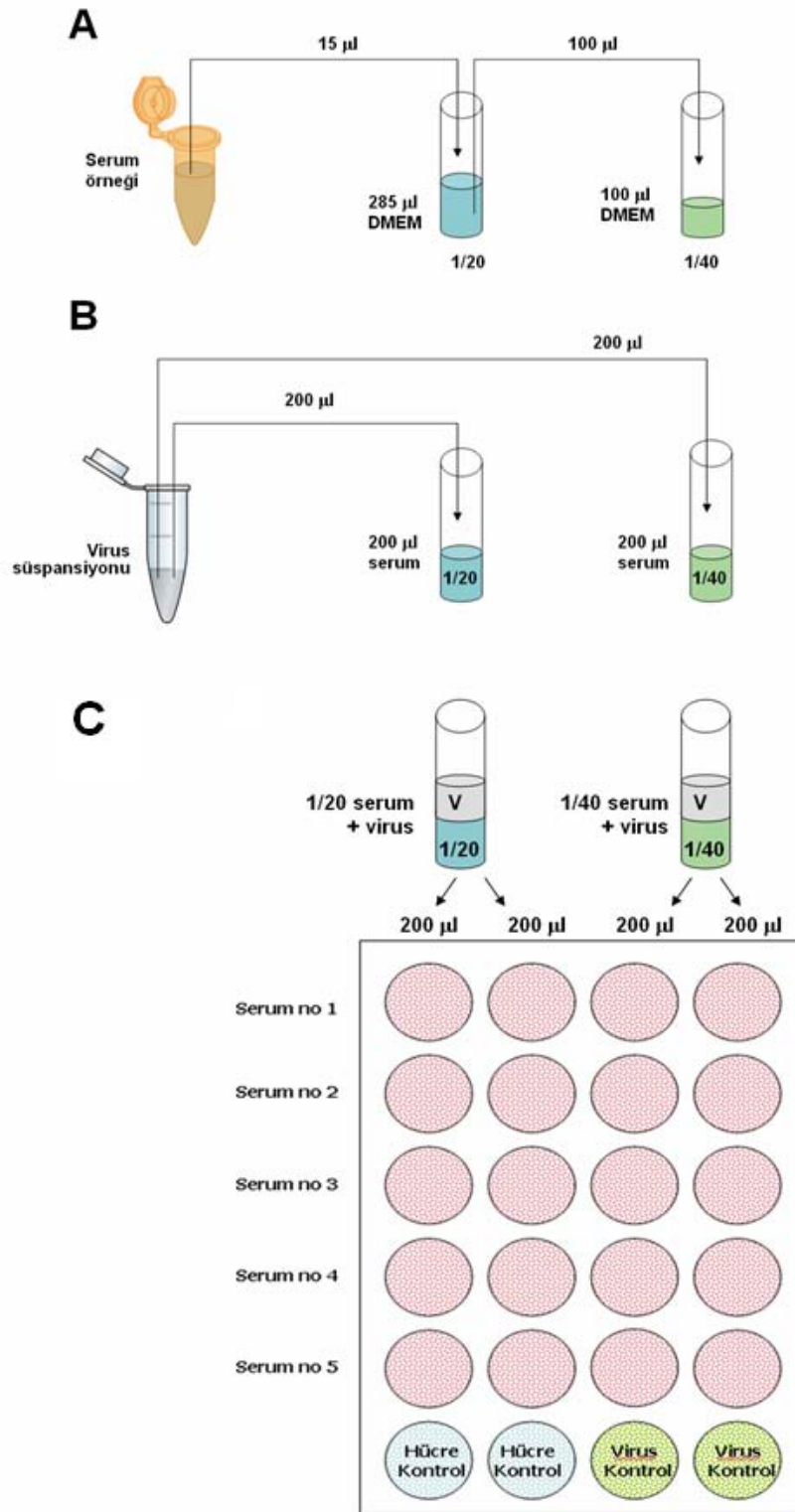
Şekil 3.5. Laboratuvarımızda Üretilen Batı Nil Virusunun Vero Hücre Kültüründe Oluşturduğu Sitopatik Etki ("Inverted" mikroskop, 10X)

F. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)'nin Uygulanması

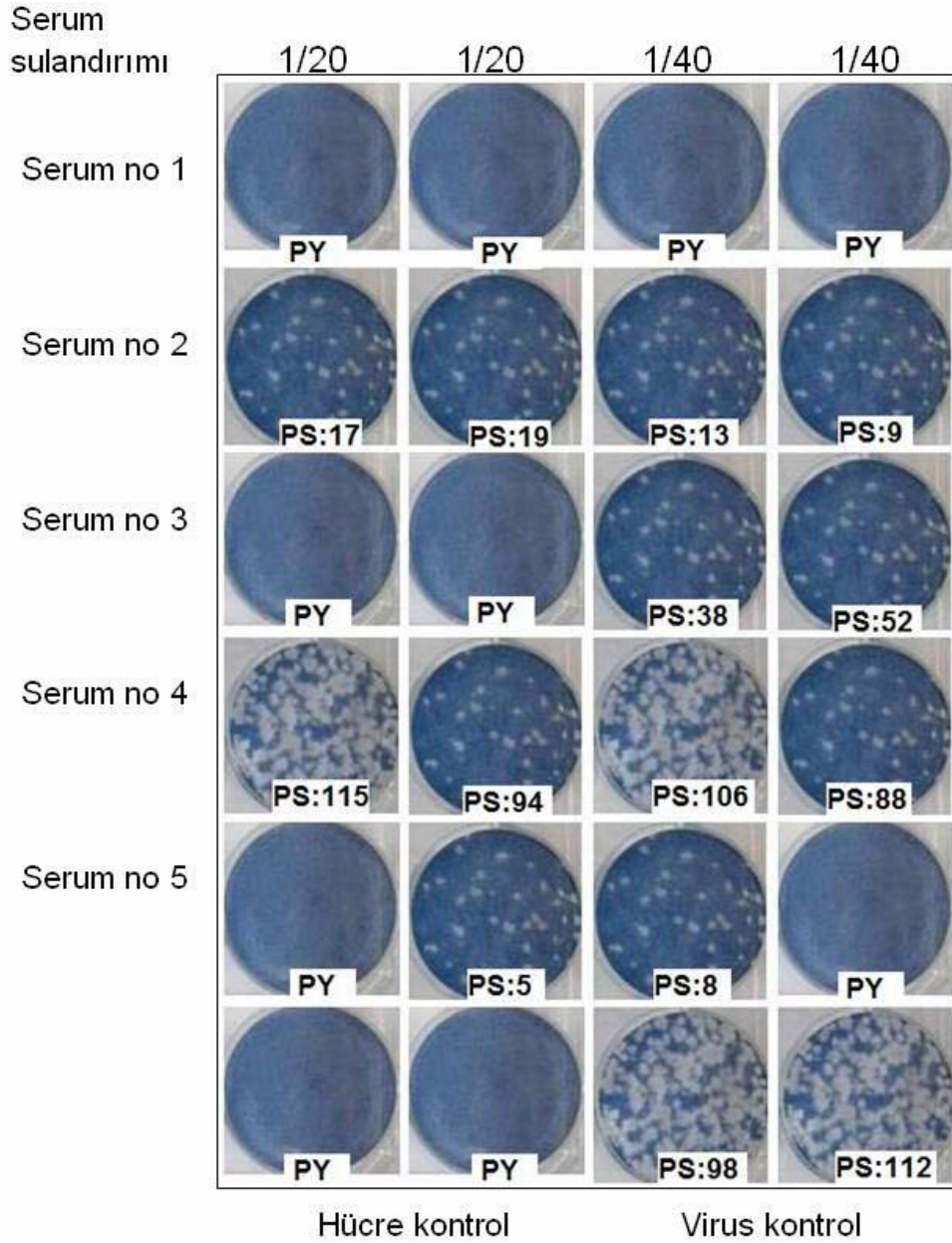
PRNT için, 24 çukurlu mikropaklarda tek tabaka olarak üretilen Vero hücre kültürleri kullanılmış ve yöntem biyogüvenlik kabini içinde aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (121, 124).

1. Çalışılacak serum örnekleri 56°C'de 30 dakika süre ile inaktive edildi.
2. Her bir serum örneğinin 1/20 ve 1/40 oranındaki sulandırılmaları DMEM kullanılarak steril ependorf tüpler içerisinde hazırlandı (Şekil 3.6.A).
3. Stok virus suşu (West Nile virus NY99-4132 strain), DMEM içinde 1/300 oranında sulandırıldıktan sonra (Bkz. Kısım 3.4.2.1), her bir serum dilüsyonu ile 1:1 hacimde steril ependorf tüpler içerisinde karşılaştırıldı ve 1 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi (Şekil 3.6.B). Bu inkübasyon sırasında, serumlar içerisinde –eğer varsa- özgül antikorların virus ile birleşmesi beklenmektedir.
4. Mikropaklarda tek tabaka olarak üretilen hücre kültürlerinin vasatları boşaltıldı. Virus ile karıştırılmış her bir örnek sulandırımından (1/20 ve 1/40) 200'er µl alınarak, mikropleytin ikişer çukuruna sırasıyla inoküle edildi. Mikroplağın son sırasındaki ikişer çukur ise hücre kontrolü ve virus kontrolü olarak ayrıldı. Hücre kontrolü çukurlarına sadece üretme vasatı (200 µl), virus kontrolü çukurlarına ise sadece virus süspansiyonu (200 µl) eklendi (Şekil 3.6.C).
5. Mikropak, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de bir saat inkübe edildi. Bu inkübasyon sırasında, virusun –eğer antikorlar tarafından nötralize edilmemiş ise- hücrelere adsorbe olması beklenmektedir.
6. İnkübasyon sonrası, her bir mikropak çukuruna, ortamın stabilize edilmesi amacıyla 1 ml %1.6'lık karboksi-metil-selüloz (CMC; Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edildi. Plaklar %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve her gün mikroskop altında kontrol edilmek suretiyle CPE odakları (plak) yönünden izlendi.

7. İnkübasyonun dördüncü gününde, hücrelerin üzerindeki CMC uzaklaştırılmaksızın, tüm çukurlara PBS içinde hazırlanmış %10'luk formaldehit solüsyonu eklendi ve 20 dakika oda ısısında fikse edildi.
8. Fiksasyon işleminden sonra hücreler %0.35'lik kristal viyole ile boyandı, kurutuldu ve her örnek sulandırımına ait çukurlarda oluşan plaklar sayıldı. Yöntemin geçerliliği; hücre kontrol çukurlarında hiç plak oluşmaması, virus kontrol çukurlarında ise >80 adet plak oluşumunun gözlenmesi olarak kabul edildi (Şekil 3.7) (124).
9. Değerlendirmede, virus kontrol çukurlarından elde edilen ortalama plak sayısı ile serum örneklerinin bulunduğu çukurlardaki ortalama plak sayısı karşılaştırıldı. Virus kontrol çukurundaki plak sayısının %80 ve daha yüksek oranda azalmasına yol açan en yüksek serum sulandırımı, o örneğin BNV nötralizan antikor titresini (PRNT₈₀) olarak değerlendirildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testinin Uygulanması. **A.** Serum sulandırımının hazırlanması, **B.** Virus ile serum sulandırımının karıştırılması, **C.** PRNT plağının hazırlanması.



Şekil 3.7. PRNT sonuçlarının Değerlendirilmesinde İzlenen Metodoloji (Resimler www.biolsci.org/v06p0294.htm'den alınmış ve sayılar örnek olması için rastgele verilmiştir)

Yukarıdaki örnekte; virus kontrol çukurlarındaki ortalama plak sayısının $(98+112=210/2=105)$ %80'i 84 olduğundan, $PRNT_{80} = 105-84=21$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre ≤ 21 adet plak sayılan çukurlar antikor pozitif, ≥ 22 adet plak sayılan çukurlar antikor negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.1). PY: Plak yok; PS: Plak sayısı.

Tablo 3.1. Şekil 3.7’de PRNT Testi Sonuçları Gösterilen Serum Örneklerinin Değerlendirilmesi (Hesaplama için örnek olarak verilmiştir)

Serum no	Ortalama plak sayısı		Sonuç
	1/20	1/40	
1	0	0	1/40
2	18	11	1/40
3	0	45	1/20
4	104	94	Negatif
5	3	4	1/40

3.5. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) ile Antijenik İlişkisi Olan Diğer Flaviviruslara Karşı IgG Antikorlarının Araştırılması

Artropod-kaynaklı flaviviruslar (Japon ensefaliti, St.Louis ensefaliti, Dengue, sarı humma virusları) arasındaki antijenik benzerlikler nedeniyle, özellikle bu virusların epidemik/epizootik olarak bulunduğu bölgelerde, doğal enfeksiyon ya da aşılama sonucu oluşan antikorlar, serolojik testlerde BNV antikorları ile çapraz reaksiyon vermekte ve yalancı pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (11, 120). Bu olasılığın dışlanabilmesi amacıyla bu çalışmada, ELISA ile BNV IgG pozitif/sınırdaki pozitif bulunan donör serumlarında, Dengue (DEN) ve kene ensefaliti (Tick-borne encephalitis, TBE) virusuna karşı IgG antikorları ELISA yöntemiyle, sarı humma (Yellow fever, YF) virusuna karşı IgG antikorları ise IFA yöntemiyle araştırılmıştır. Japon ensefaliti ve St.Louis ensefaliti viruslarının çok sınırlı coğrafi dağılım göstermesi nedeniyle bu viruslar göz ardı edilmiştir.

3.5.1. Donör serumlarında Dengue Virusuna (DENV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması

ELISA ile BNV IgG antikorları pozitif/şüpheli pozitif sonuç veren donör serumlarında DENV IgG antikorlarının varlığı, kantitatif ticari bir ELISA kiti (Anti-Dengue IgG ELISA; Euroimmun, Almanya) ile araştırılmıştır. Yöntem, 1/101 serum sulandırımları kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce tarif edilen (Kısım 3.3.1, Madde 1-10) yönteme benzer şekilde uygulanmıştır (125). Üretici firma bu testin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak vermektedir.

3.5.2. Donör serumlarında Kene Ensefaliti Virusuna (TBEV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması

ELISA ile BNV IgG antikorları pozitif/şüpheli pozitif sonuç veren donör serumlarında TBEV IgG antikorlarının varlığı, kantitatif ticari bir ELISA kiti (Anti-TBE IgG ELISA; Euroimmun, Almanya) ile araştırılmıştır. Yöntem, 1/101 serum sulandırımları kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce tarif edilen (Kısım 3.3.1, Madde 1-10) yönteme benzer şekilde uygulanmıştır (125). Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü, üretici firma tarafından %100 olarak bildirilmektedir.

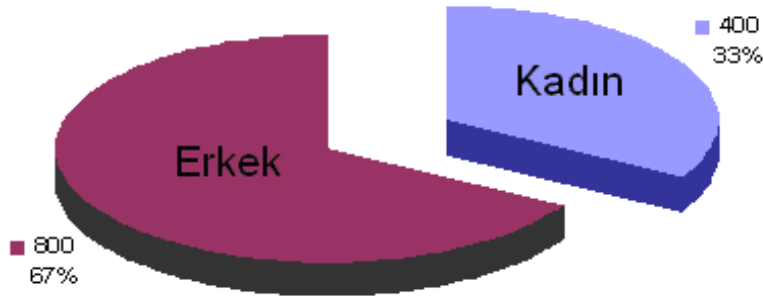
3.5.3. Donör serumlarında Sarı Humma Virusuna (YFV) Karşı IgG Antikor Varlığının Araştırılması

ELISA ile BNV IgG antikorları pozitif/şüpheli pozitif sonuç veren donör serumlarında YFV IgG antikorlarının varlığı, ticari bir IFA kiti (Anti-Yellow Fever IgG IIFT; Euroimmun, Almanya) ile araştırılmıştır. Yöntem, 1/100 serum sulandırımları kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce tarif edilen (Kısım 3.4.1, Madde 1-9) yönteme benzer şekilde uygulanmıştır (125). Bu testin üretici firma tarafından verilen duyarlılık ve özgüllüğü %94.7'dir.

BULGULAR

4.1. Kan Donörlerinin Demografik Bulguları ve Risk Faktörleri

Çalışmaya dahil edilen 1200 kan donörünün 400'ü kadın, 800'ü erkek olup yaşları 18-61 yıl arasında (yaş ortalaması 37.8 yıl) değişmektedir (Şekil 4.1). Kadınların yaş ortalaması 38.0 yıl, erkeklerin yaş ortalaması ise 32.9 yıl olarak belirlenmiş; donörlerin yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmaya Alınan Kan Donörlerinin Cinsiyet Dağılımı

Donörlerin 1061'i (%88) Ankara ili ve ilçelerinde, 139'u (%12) ise diğer yerleşim bölgelerinde ikamet etmektedir. Bu 139 donörün 45'i (%32) Ankara çevre illerinden (Aksaray, Bolu, Çankırı, Çorum, Afyon, Kayseri, Konya, Karaman, Kastamonu, Kırıkkale, Kırşehir, Tokat) ve 94'ü (%68) diğer illerden (Adana, Adıyaman, Amasya, Antalya, Aydın, Balıkesir, Batman, Bilecik, Bursa, Diyarbakır, Elazığ, Gaziantep, Hatay, İstanbul, İzmir, Kocaeli, Kütahya, Malatya, Mardin, Mersin, Muş, Nevşehir, Ordu, Osmaniye, Sakarya, Samsun, Sinop, Sivas, Trabzon, Van, Zonguldak) gelen kişilerdir.

Çalışmaya katılmayı kabul eden kan donörlerinin 444'ü (%37) memur, 384'ü (%32) serbest meslek sahibi ve 60'ı (%5) çiftçi iken, 312'si (%26) herhangi bir meslek grubuna dahil değildir.

Tablo 4.1. Kan Donörlerinin Cinsiyet ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Yaş Grubu (yıl)	Kadın (n)	Erkek (n)	Toplam (n)
18 - 27	100	238	338
28 - 37	105	329	434
38 - 47	124	179	303
48 - 57	63	48	111
≥58	8	6	14
Toplam	400	800	1200

Kan donörlerinin “Kan Bağışçısı Bilgi Formu” (Ek 3) kapsamında yapılan sorgulamaları sonucu elde edilen veriler, arboviral enfeksiyon riski açısından değerlendirilmiş ve donörlerin %60.8’inde (730/1200) risk faktörü varlığı saptanmıştır. Bu faktörler arasında; açık (kırlık/çalılık/ormanlık) alanda bulunma (n=295; %24.5), yaşam/çalışma ortamında sivrisinek/kene ile karşılaşma (n=92; %7.6), kendisi veya yakınında kene ısırığı (n=45; %3.7), yaşam/çalışma alanında ölü kuş/kanatlı hayvan ile karşılaşma (n=30; %2.5), yaşam/çalışma alanında evcil/kümes/binek hayvanı varlığı (n=97; %8), çiğ süt/süt ürünleri tüketimi (n=147; %12.2), uzun süreli yurt dışında bulunma (özellikle Asya, Avrupa, Afrika ve Orta Doğu ülkeleri) (n=21; %1.7), yurt dışına giriş-çıkışlarda veya orada yaşanan süre içinde sarı humma, kene ensefaliti ve Japon ensefaliti gibi arbovirus aşılı ile aşılama öyküsü (n=3; %0.2) yer almaktadır.

4.2. Serum Örneklerinde Batı Nil Virusu (BNV) ELISA IgG Antikor Bulguları

ELISA yöntemi ile 1200 kan donörünün 18'inde BNV IgG pozitif (≥ 20 RU/ml), 1'inde ise sınırda pozitif (17.6 RU/ml)) olmak üzere toplam 19'unun (%1.6) serum örneğinde BNV IgG antikor varlığı saptanmıştır. Örneklerin %98.4'ü (1181/1200) ise BNV IgG antikorları açısından negatif bulunmuştur (Tablo 4.2).

ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 donörün demografik bilgileri, risk faktörleri varlığı ve kantitatif ELISA IgG değerleri Tablo 4.3'de birey bazında sunulmaktadır.

Tablo 4.2. BNV Kantitatif ELISA IgG Sonuçları

BNV IgG (Kantitatif değer)	Erkek Sayı (%)*	Kadın Sayı (%)*	Toplam Sayı (%)*
Pozitif (≥ 20 RU/ml)	12 (1.5)	6 (1.5)	18 (1.5)
Sınırda pozitif (15-19 RU/ml)	0	1 (0.25)	1 (0.08)
Negatif (<15 RU/ml)	788 (98.5)	393 (98.3)	1181 (98.4)
Toplam	800 (100)	400 (100)	1200 (100)

* Sütun yüzdesidir.

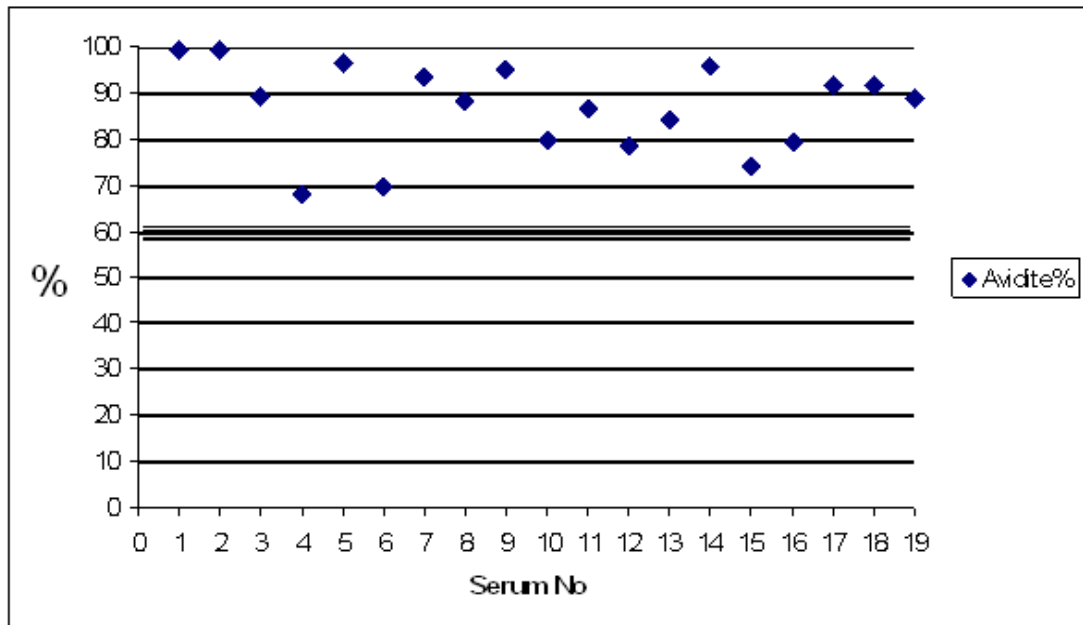
Tablo 4.3. BNV IgG Antikor Pozitifliği Saptanan Donörlerin Demografik Özellikleri, Risk Faktörleri ve ELISA IgG Değerleri

Donör No	Cinsiyet / Yaş	Meslek	Yaşadığı il/ilçe	Risk Faktörü	ELISA-IgG*
1	E / 29	Serbest	Ankara/Keçiören	Açık alanda bulunma	112.3
2	E / 37	Serbest	Ankara/Merkez	-	142.9
3	K / 48	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	149.7
4	E / 43	Serbest	Mardin/Kızıltepe	Açık alanda bulunma, çiğ süt tüketimi	143.3
5	E / 53	Serbest	Antalya/Serik	Açık alanda bulunma	167.4
6	E / 43	Memur	Ankara/Mamak	Kene ile temas, çiğ süt tüketimi	28.3
7	K / 55	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	185.1
8	E / 49	Memur	Osmaniye/Kadirli	Açık alanda bulunma, kene ile temas, çiğ süt tüketimi	158.1
9	K / 44	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	116.2
10	K / 40	Memur	Ankara/Yenimahalle	Açık alanda bulunma	17.6**
11	E / 30	Serbest	Ankara/Merkez	-	126.8
12	E / 34	Serbest	Ankara/Pursaklar	-	74.9
13	E / 36	Memur	Batman/Merkez	Sivrisinek teması	132.2
14	K / 42	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	99.2
15	E / 28	Memur	Ankara/Yenimahalle	-	25.6
16	K / 22	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	183.4
17	K / 42	Ev hanımı	Ankara/Merkez	-	142.1
18	E / 46	Memur	Ankara/Sincan	Açık alanda bulunma, çiğ süt tüketimi	66.2
19	E / 33	Memur	Ankara/Keçiören	-	36.4

* Kantitatif değer (RU/ml); ** Sınırdan pozitif; E: Erkek; K: Kadın.

4.2.1. BNV ELISA IgG Pozitifliği Saptanan Örneklerde IgG Avidite Testi Bulguları

Çalışmada, ELISA ile BNV IgG antikorları pozitif bulunan 19 kan donörünün serum örneklerine, virus ile karşılaşma zamanının öngörülebilmesi amacıyla BNV IgG avidite testi uygulanmıştır. Avidite indeksi (Aİ) >60 bulunan örnekler yüksek aviditeli IgG pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Örneklerin tümünde yüksek aviditeli IgG antikorları saptanmış ve Aİ değer aralığının $\%67.8$ ile $\%99.2$ arasında değiştiği (ortalama Aİ: $\%86.7$) belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. BNV ELISA IgG Pozitif Örneklerde IgG Avidite İndeksi (%) Değerlerinin Dağılımı

4.2.2. Risk Faktörlerine göre BNV ELISA IgG Pozitifliğinin Değerlendirilmesi

Arboviral enfeksiyonlar için risk faktörü taşıdığı saptanan 730 kan donörünün 13'ünde ($\%1.8$) BNV IgG antikor pozitifliği belirlenmiştir. Son altı ay içerisinde açık alanda bulunduğunu ifade eden 295 bireyin 6'sında ($\%2.03$); pastörize edilmemiş süt/süt ürünleri tükettiğini belirten 147 bireyin

4'ünde (%2.7); yaşadığı/çalıştığı alanda sivrisinek ve kene gibi böceklerle karşılaştığını belirten 92 bireyin 1'inde (%1.08); kendisi veya bir yakınının yaşamı boyunca en az bir kere kene tarafından ısırıldığını belirten 45 donörün 1'inde (%2.2) ve yaşadığı/çalıştığı alanda ölü kuşlara ya da başka kanatlı hayvanlara rastladığını ifade eden 30 donörün 1'inde (%3.3) BNV IgG antikorları pozitif bulunmuştur (Tablo 4.4). Buna karşın, yaşadığı/çalıştığı alanda evcil hayvan, kümes hayvanı ya da binek hayvanı bulunduğunu ifade eden 97; uzun süreli yurt dışında bulunduğunu belirten 21 ve yurt dışı seyahatleri sırasında arboviral aşılarda aşılama öyküsü olan 3 donörün hiçbirisinde BNV IgG pozitifliği saptanmamıştır (Tablo 4.4).

ELISA ile BNV IgG antikor pozitifliği saptanan 19 kan donörü irdelendiğinde ise; 8'inde (%42.1) risk faktörü mevcutken, 11'inde (%57.9) herhangi bir risk faktörünün olmadığı görülmüştür (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Arboviral Enfeksiyonlar Açısından Risk Faktörü Saptanan Donörlerde BNV IgG Antikor Pozitifliği

Risk faktörü	Donör sayısı*	BNV IgG pozitif donör sayısı (%)
Açık alanda bulunma	295	6 (2.03)
Çiğ süt/süt ürünleri tüketimi	147	4 (2.7)
Yaşam/çalışma alanında evcil/kümes/binek hayvanı varlığı	97	0
Yaşam/çalışma ortamında sivrisinek/kene ile karşılaşma	92	1 (1.08)
Kendisi veya yakınında kene ısırığı	45	1 (2.2)
Yaşam/çalışma alanında ölü kuş/kanatlı hayvan ile karşılaşma	30	1 (3.3)
Uzun süreli yurt dışında bulunma	21	0
Arbovirus aşılı ile aşılama öyküsü	3	0
Toplam	730	13 (1.8)

*Bazı donörlerde birden fazla risk faktörü mevcuttur.

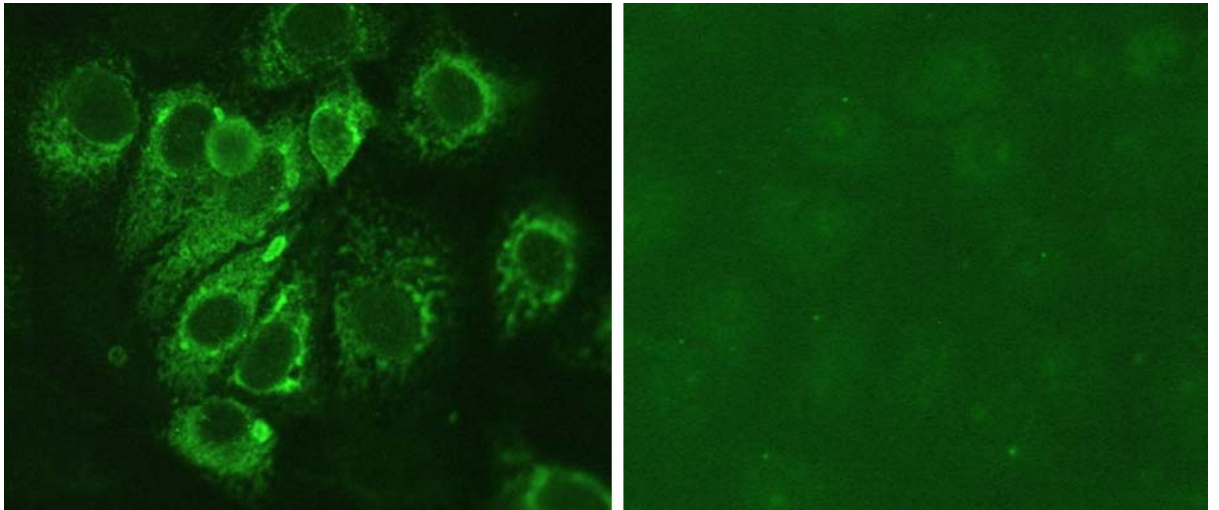
4.3. Serum Örneklerinde Batı Nil Virus (BNV) IgG Antikor Pozitifliği Doğrulama Testleri ile İlgili Bulgular

ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 serum örneğinin doğrulanması amacıyla yapılan indirekt immüno Floresan antikor yöntemi ve plak redüksiyon nötralizasyon testi ile ilgili bulgular aşağıda verilmiştir.

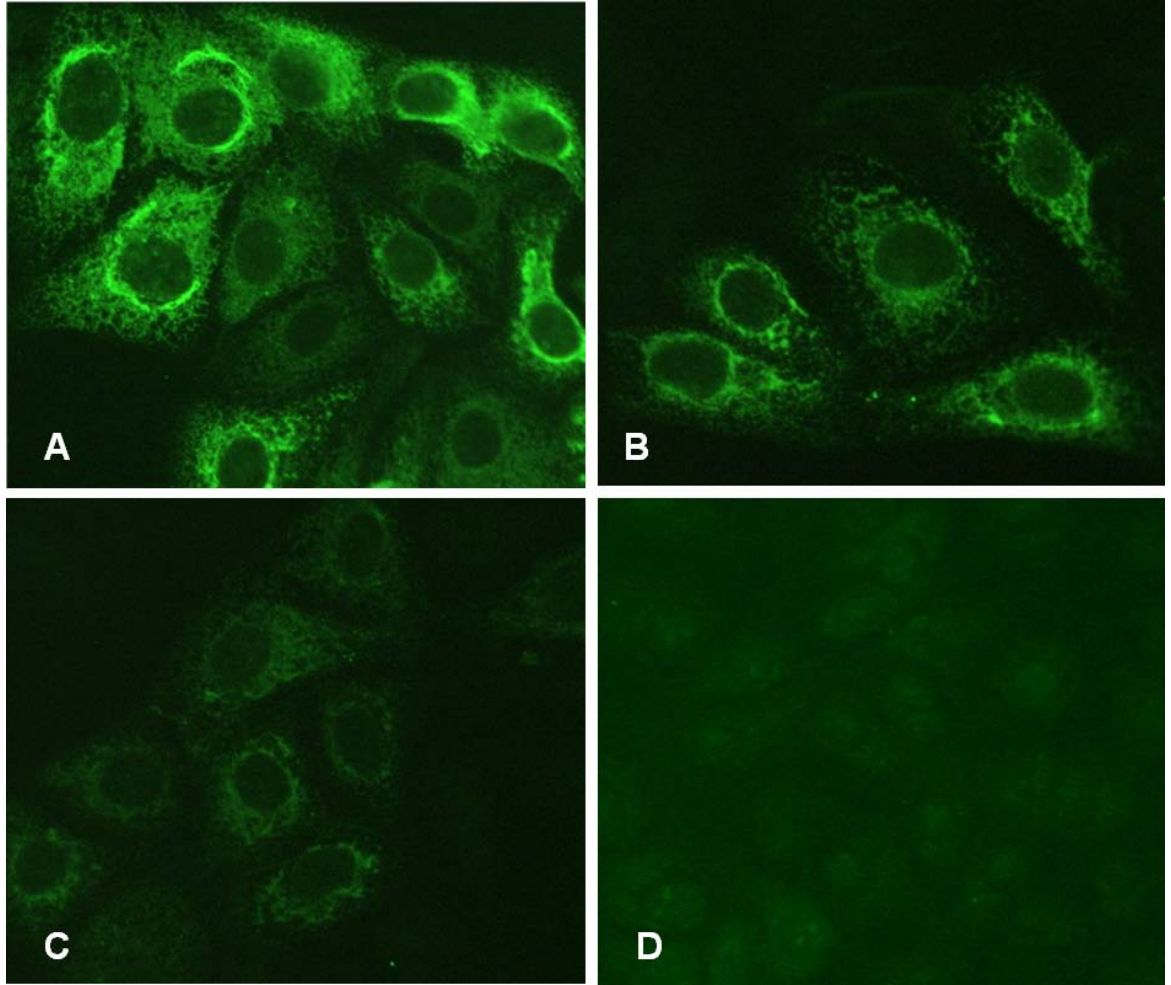
4.3.1. İndirekt İmmüno Floresan Antikor (IFA) Testi Bulguları

IFA testi ile 1/100 tarama titresinde çalışılan 19 serum örneği, floresan mikroskopta pozitif ve negatif kontrol serumları ile alınan floresansın şiddeti ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar kalitatif olarak zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) pozitif şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 örneğin 15'i (%78.9) IFA ile de pozitif bulunmuş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 4.5'de, örnekler için ayrı ayrı olarak ise Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Buna göre; örneklerin 7'si (%36.8) güçlü pozitif, 7'si (%36.8) orta pozitif ve 1'i (%5.2) zayıf pozitif olarak saptanmış, 4 örnek (%21) ise negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. BNV IgG IFA Yönteminde Pozitif (solda) ve Negatif (sağda) Kontrol Serumlarının Görünümü (Floresan mikroskop, 40x)

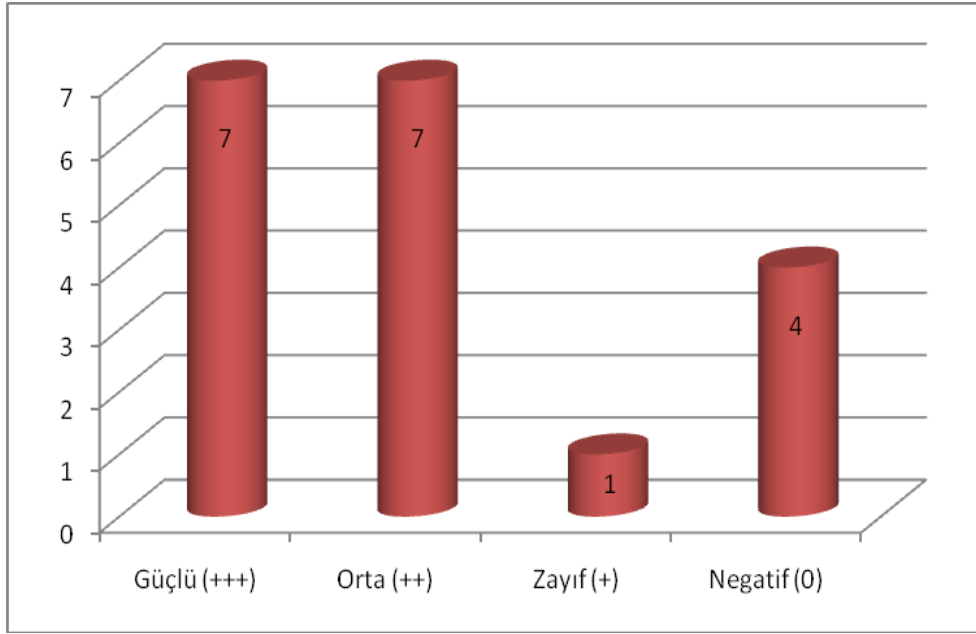


Şekil 4.4. BNV IgG IFA Yönteminde; A) Güçlü pozitif, B) Orta pozitif, C) Zayıf pozitif ve D) Negatif sonuç veren örneklerin görünümü (Floresan mikroskop, 40x)

Tablo 4.5. Örneklerin ELISA BNV IgG ve IFA BNV IgG Sonuçlarının Karşılaştırılması (n=19)

IFA BNV IgG	ELISA BNV IgG pozitif	
	Erkek (Sayı)	Kadın (Sayı)
Güçlü pozitif (+++)	5	2
Orta pozitif (++)	4	3
Zayıf pozitif (+)	0	1
Negatif	3	1*
Toplam	12	7

* Sınırdan pozitif



Şekil 4.5. IFA Yöntemi ile Elde Edilen BNV IgG Değerlerinin Dağılımı

4.3.2. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT) Bulguları

Çalışmada, ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 serum örneğinin doğrulanması için referans yöntem olarak kabul edilen PRNT uygulanmıştır. Bu yöntemde, örneklerin 1/20 ve 1/40 sulandırılmaları ile karıştırılan standart virus suşu, mikropklarda tek tabaka olarak üretilen Vero hücre kültürlerine inoküle edilmiştir. İnkübasyonun dördüncü günü sonunda yapılan değerlendirmede; virus kontrol çukurları ortalama plak sayısında ≥ 80 oranda azalmaya yol açan en yüksek serum sulandırımı, o örneğin BNV nötralizan antikor titresi (PRNT₈₀) olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.6).

PRNT testi sonunda, 19 serum örneğinin dokuzunda 1/40, birinde ise 1/20 titrede olmak üzere toplam 10'unda (%52.6) pozitiflik saptanmış ve BNV antikor varlığı doğrulanmıştır. Örneklerden elde edilen PRNT sonuçları, ELISA IgG ve IFA IgG sonuçları ile birlikte Tablo 4.6'da, karşılaştırmalı olarak ise Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Örneklerde Saptanan BNV ELISA IgG, IFA IgG ve PRNT₈₀ Sonuçları

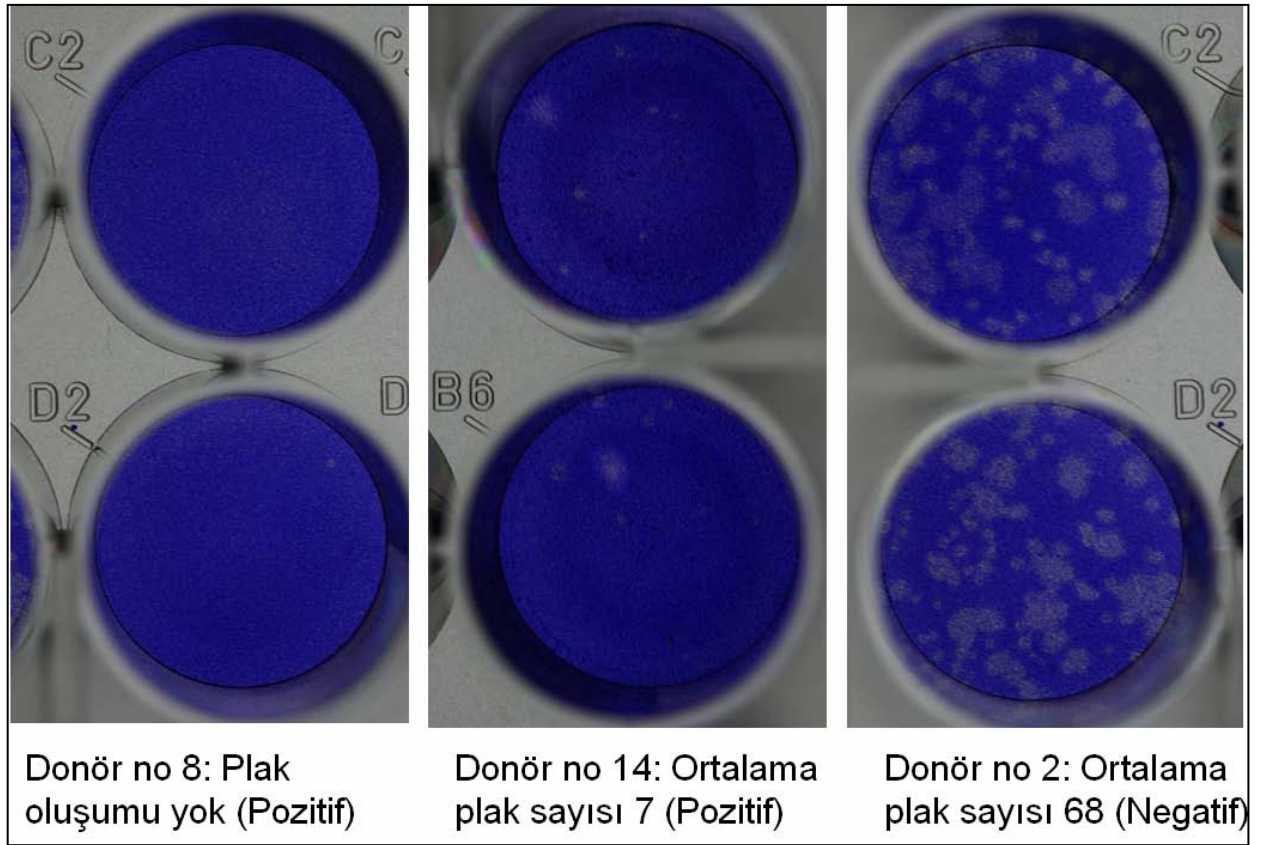
Donör No	BNV		
	ELISA IgG (RU/ml)	IFA IgG	PRNT ₈₀ titresi
1	112.3	++	N
2	142.9	+++	N
3	149.7	+++	1/40
4	143.3	+++	N
5	167.4	+++	N
6	28.3	N	1/40
7	185.1	+++	1/40
8	158.1	++	1/40
9	116.2	++	N
10	17.6*	N	1/40
11	126.8	++	1/20
12	74.9	+++	N
13	132.2	++	1/40
14	99.2	++	1/40
15	25.6	N	N
16	183.4	+	1/40
17	142.1	++	N
18	66.2	+++	N
19	36.4	N	1/40
Toplam pozitif sayı	19	15	10

* Sınırdan pozitif

Tablo 4.7. BNV ELISA IgG, IFA IgG ve PRNT Sonuçlarının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi (n=19)

PRNT	ELISA BNV IgG	IFA BNV IgG	
	Pozitif*	Pozitif	Negatif
Pozitif	10	7	3
Negatif	9	8	1
Toplam	19	15	4

*Sınırdaki pozitif örnek, pozitif sonuçlara dahil edilmiştir.



Şekil 4.6. Plak redüksiyon nötralizasyon testi ile BNV Antikorları Pozitif ve Negatif Olarak Değerlendirilen Örnek Donör Serumları

4.4. Serum Örneklerinde BNV ile İlişkili Diğer Flaviviruslara Karşı IgG Antikorlarının Araştırılması ile İlgili Bulgular

ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 örnekte, çapraz reaktivite olasılığının araştırılması için Dengue (DENV), sarı humma (YFV) ve kene ensefaliti (TBEV) viruslarına karşı IgG antikor varlığı da araştırılmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.4.1. DENV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular

Kantitatif ELISA yöntemi ile araştırılan DENV IgG antikorları, 19 donör serumunun 3'ünde (%15.7) pozitif olarak saptanmıştır. Bu örneklerin (Donör no 5, 7 ve 18) IgG düzeyleri sırasıyla; 59.2 RU/ml, 176.9 RU/ml ve 44 RU/ml olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8).

4.4.2. TBEV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular

Serum örneklerinde TBEV IgG antikorlarının varlığı, kantitatif ELISA yöntemi ile araştırılmış ve 19 örneğin hiçbirisinde pozitiflik saptanmamıştır (Tablo 4.8).

4.4.3. YFV IgG Antikor Varlığı ile İlgili Bulgular

Sarı humma virusuna karşı IgG antikorlarının varlığı, IFA yöntemi ile araştırılmış ve 19 örneğin ikisinde (%10.5) pozitiflik saptanmıştır. Bu örneklerden birisi (Donör no 5) orta pozitif (++), diğeri ise (Donör no 11) zayıf pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.8).

4.5. Çalışmada Elde Edilen Tüm Verilerin Birlikte Değerlendirilmesi

Çalışmada BNV'na karşı elde edilen serolojik veriler, DENV, TBEV ve YFV IgG verileri ile birlikte niteliksel yönden karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Ayrıca çalışmanın tüm bulgularının birarada izlenebilmesi için veriler toplu olarak Tablo 4.9'da sunulmaktadır.

Tablo 4.8. Örneklerde BNV, DENV, TBEV ve YFV Antikorları İçin Elde Edilen Niteliksel Serolojik Sonuçlar ve Değerlendirme

Donör No	BNV			DENV ELISA IgG	TBEV ELISA IgG	YFV IFA IgG	Değerlendirme
	ELISA IgG	IFA IgG	PRNT				
1	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
2	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
3	+	+	+	-	-	-	Cf
4	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
5	+	+	-	+	-	+	NN BNV Ab; ÇR
6	+	-	+	-	-	-	Cf; BNV IFA'da DS
7	+	+	+	+	-	-	Cf; DENV IgG'de ÇR
8	+	+	+	-	-	-	Cf
9	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
10	±	-	+	-	-	-	Cf; BNV IFA'da DS
11	+	+	+	-	-	+	Cf; YFV IgG'de ÇR
12	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
13	+	+	+	-	-	-	Cf
14	+	+	+	-	-	-	Cf
15	+	-	-	-	-	-	BNV ELISA'da ÖS
16	+	+	+	-	-	-	Cf
17	+	+	-	-	-	-	NN BNV Ab
18	+	+	-	+	-	-	NN BNV Ab; DENV IgG'de ÇR
19	+	-	+	-	-	-	Cf

(+): Pozitif, (±): Sınırdan pozitif; (-): Negatif; BNV: Batı Nil virusu; DENV: Dengue virusu; TBEV: Kene ensefaliti virusu; YFV: Sarı humma virusu; Cf: Doğrulanmış (Confirmed) BNV antikor pozitifliği; NN BNV Ab: Nötralizan olmayan (Non-Neutralizing Antibody) BNV antikor pozitifliği; ÇR: Çapraz reaktivite; DS: Duyarlılık sorunu; ÖS: Özgüllük sorunu.

Tablo 4.9. Batı Nil Virusu ELISA IgG Pozitif Donörlerin Demografik Özellikleri, Risk Faktörleri ve Test Sonuçları (n=19)

Donör No	Cinsiyet / Yaş	Yaşadığı İl/ İlçe	Risk Faktörü Varlığı	BNV				DENV ELISA IgG*	TBEV ELISA IgG*	YFV IFA IgG
				ELISA IgG*	Aİ %	IFA IgG	PRNT			
1	E / 29	Ank/Keçiören	Açık alanda bulunma	112.3	99.2	++	N	N	N	N
2	E / 37	Ank/Merkez	-	142.9	99.0	+++	N	N	N	N
3	K / 48	Ank/Merkez	-	149.7	89.1	+++	1/40	N	N	N
4	E / 43	Mardin/Kızıltepe	Açık alanda bulunma, çiğ süt tüketimi	143.3	67.8	+++	N	N	N	N
5	E / 53	Antalya/Serik	Açık alanda bulunma	167.4	96.2	+++	N	59.2	N	++
6	E / 43	Ank/Mamak	Kene ile temas, çiğ süt tüketimi	28.3	69.6	N	1/40	N	N	N
7	K / 55	Ank/Merkez	-	185.1	93.2	+++	1/40	176.9	N	N
8	E / 49	Osmaniye/Kadirli	Açık alanda bulunma, kene ile temas, çiğ süt tüketimi	158.1	88.1	++	1/40	N	N	N
9	K / 44	Ank/Merkez	-	116.2	94.6	++	N	N	N	N
10	K / 40	Ank/Yenimahalle	Açık alanda bulunma	17.6**	79.7	N	1/40	N	N	N
11	E / 30	Ank/Merkez	-	126.8	86.4	++	1/20	N	N	+
12	E / 34	Ank/Pursaklar	-	74.9	78.2	+++	N	N	N	N
13	E / 36	Batman/Merkez	Sivrisinek ile temas	132.2	83.9	++	1/40	N	N	N
14	K / 42	Ank/Merkez	-	99.2	95.6	++	1/40	N	N	N
15	E / 28	Ank/Yenimahalle	-	25.6	73.9	N	N	N	N	N
16	K / 22	Ank/Merkez	-	183.4	79.3	+	1/40	N	N	N
17	K / 42	Ank/Merkez	-	142.1	91.2	++	N	N	N	N
18	E / 46	Ank/Sincan	Açık alanda bulunma, çiğ süt tüketimi	66.2	91.6	+++	N	44	N	N
19	E / 33	Ank/Keçiören	-	36.4	88.8	N	1/40	N	N	N

* IgG değeri RU/ml biriminde olup, pozitiflik için sınır değeri ≥ 20 RU/ml'dir.

** Sınırdaki pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Ank: Ankara; Aİ: Avidite indeksi; BNV: Batı Nil virüsü; DENV: Dengue virüsü; TBEV: Kene ensefaliti virüsü; YFV: Sarı humma virüsü; E: Erkek; K: Kadın; N: Negatif.

TARTIŞMA

Batı Nil virusu (BNV), dünya üzerinde çok farklı ekolojik ortamlarda yaygın olarak bulunmakta ve başta *Culex* türleri olmak üzere birçok sivrisinek türü tarafından taşınarak özellikle kuşlar ve diğer omurgalılar arasında yaşam döngüsünü sürdürmektedir. Özgül bir antiviral tedavinin ve etkin bir insan aşısının olmaması, BNV enfeksiyonlarından korunmada sivrisinek temasının önlenmesi ve vektör kontrolünü ön plana çıkarmaktadır. Ancak virusu bulaştıran vektörlerin yaygınlığı ve enfekte ettiği omurgalı hayvan türlerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, BNV enfeksiyonlarının tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam edeceği açıktır (9).

Yayılmı, önceleri Afrika, Asya, Avrupa ve Avusturalya gibi Eski Dünya ülkeleri ile sınırlı olan BNV'nun, 1999 yılında Yeni Dünya'ya ulaşmasıyla, enfeksiyonların tabiatı ve virusun özelliklerinin de değişikliğe uğradığı fark edilmiştir (3, 13). Zira BNV, o zamana kadar hiç olmadığı ölçüde geniş kuş ve at popülasyonu ölümüne yol açmış ve hızlı bir yayılım trendi ile önce ABD'nin diğer eyaletlerine, sonra da tüm Amerika kıtasına yayılarak 1999-2009 yılları arasında yaklaşık 29.600 insan (1.423 ölüm) olgusunun ortaya çıkmasına neden olmuştur (3, 6, 8, 28). ABD'nde yapılan çalışmalar, viral mutasyon ve ekolojik şartlardaki değişim sonucunda, BNV enfeksiyonlarının bulaş yollarında ve klinik seyrinde farklı dinamiklerin görülebileceğine işaret etmektedir (13, 18, 21, 86).

Ülkemiz, BNV'nun endemik ve epizootik olarak görüldüğü bir coğrafi bölgenin tam ortasında yer almaktadır (Şekil 2.1). Türkiye, hem ekolojik koşullar ve sivrisinek faunası, hem de göçmen kuşların göç yolları üzerinde bulunması açısından BNV dolaşımına oldukça açık bir konumdadır. Ülkemizde BNV enfeksiyonlarının da dahil olduğu arboviral hastalıklar, bunların özellikleri ve dağılımı konusunda sınırlı düzeyde veri bulunmaktadır. Bu konuda yapılan öncü çalışmalarda, daha ziyade kısıtlı bir çalışma grubu hedef alınmış ve duyarlılık ve özgüllüğü görece olarak düşük serolojik yöntemler kullanılmıştır (89, 90). Meço, 1977 yılında yayınlanan çalışmasında, Türkiye'de BNV enfeksiyonu varlığını ilk kez serolojik olarak ortaya koymuştur (89). Güney Doğu Anadolu bölgesinde yapılan

bu çalışmada, 937 kişinin serum örneğinde BNV seropozitifliği hemagglütinasyon inhibisyon (Hİ) yöntemiyle %42.8 gibi oldukça yüksek oranda bulunmuştur (89). 1980 yılında Serter'in Ege bölgesinde yine Hİ yöntemiyle yaptığı çalışmada ise, BNV seropozitifliği %29.1 oranında saptamıştır (90). Bu çalışmalarda elde edilen yüksek seropozitifliğin, bölgesel farklılıklara bağlı olabileceği gibi, Hİ yöntemiyle alınan sonuçların, standart yöntem olan plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile doğrulanmaması nedeniyle, flaviviruslar arasındaki çapraz reaksiyonlardan da kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Arboviral hastalıklarla ilgili olarak son yıllarda ülkemizden yayınlanan çalışmalar incelendiğinde, bu kez daha duyarlı ve özgül yöntemlerle BNV enfeksiyonlarının ülkemizde bulunduğu ilişkin yeni kanıtlar ortaya konulduğu dikkati çekmektedir. 2006 yılında Özkul ve arkadaşlarının, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladıkları farklı memeli türlerine ait serum örneklerinde PRNT yöntemi ile yaptıkları çalışmada, katırlarda %2.5, sığırlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, koyunlarda %1 ve insanlarda %20.4 oranında BNV seropozitifliği belirlenmiştir (91). Ergünay ve arkadaşlarının 2007 yılında Güney Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada, İFA yöntemiyle %16, PRNT yöntemi ile %9.5 oranında pozitiflik bulunmuştur (92). Ülkemizde yapılan seroprevalans çalışmalarının yanı sıra, klinik seyirli BNV enfeksiyonu varlığının araştırıldığı tek bir çalışmaya rastlanmaktadır. Ergünay ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan bu çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde aseptik menenjit/ensefalit ön tanısı olan 87 erişkin hastadan serum ve BOS örnekleri toplanmış ve ELISA ve İFA yöntemleri ile BNV IgM ve IgG antikoru araştırılmıştır (126). Araştırmacılar serum örneklerinin sekizinde (%9.2) IgM, üçünde (%3.4) IgG pozitifliği bulmuşlar; yaptıkları değerlendirme sonunda, tek başına IgM pozitifliği saptanan iki hastayı (%2.3) olası BNV menenjit olgusu olarak kabul etmişlerdir (126).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 epidemisi sırasında, BNV'nun kan ve kan ürünleri transfüzyonu ile bulaştığının gösterilmesi, virusun kan bankacılığı açısından da risk teşkil edebileceğini ortaya koymuştur (61, 127). 2003 yılında FDA, bulaş riskinin yüksek olduğu mevsimlerde tüm kan bankalarında vericilerin

BNV açısından klinik olarak taranması gerektiğini bildirmiş; ancak hastaların az bir kısmında semptomlar ortaya çıktığından, daha sonra tarama için nükleik asit testlerinin kullanılmasını önermiştir (62). ABD'nin bazı eyaletlerinde donörlerin BNV açısından tarama zorunluluğu 2003 yılında yasal olarak yürürlüğe girmiştir (128). Ancak dünya genelinde, kan merkezlerinde uygulanan rutin tarama testleri arasında BNV'nun yer alması konusu ile ilgili bir fikir birliği oluşmamıştır (129). Bu konuda, her ülkenin kendi seroprevalans verilerine göre bir politika belirlemesinin uygun olacağı ve seropozitiflik oranının düşük olduğu bölgelerde kan merkezlerinde BNV tarama testlerinin yapılmasına gerek olmadığı düşüncesi yaygındır (129-131).

Sunulan bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran sağlıklı kan donörlerinde BNV IgG antikor varlığının ELISA yöntemi ile araştırılması ve pozitif sonuç alınan örneklerin ileri testlerle doğrulanarak Türkiye'deki BNV seroepidemiolojik verilerine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi kan donörlerinde ilk kez araştırılan BNV seropozitifliği, ayrıca hastanemize başvuran donörlerde virusun prevalansı hakkında veri elde edilerek, kan bankacılığı konusunda muhtemel risklerin değerlendirilmesine de olanak sağlayacaktır. Ek olarak, bölgemizde BNV aktivitesinin varlığı ve düzeyinin belirlenmesi, BNV hastalıklarının belirtileri ve tanı yöntemleri konusunda bilinç oluşturulmasına yardımcı olacak ve tanısı konulamayan ateşli hastalıklar ve MSS enfeksiyonları konusuna katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda, 1200 kan donörünün 19'unda (%1.6) ELISA ile BNV IgG antikor pozitifliği saptanmıştır. Kantitatif olarak belirlenen antikor değerleri ≥ 20 RU/ml olarak bulunan 18 örnek (değer aralığı: 28.3-185.1 RU/ml) pozitif; 17.6 RU/ml olarak saptanan bir örnek sınırda pozitif (borderline) ve < 15 RU/ml bulunan 1181 (%98.4) örnek ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Ankara'da Hızel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Gazi Üniversitesi Hastanesine başvuran 2.821 sağlıklı kan donöründe BNV seropozitifliği ELISA yöntemi ile %2.4 olarak bildirilmiştir (93). Ergünay ve arkadaşlarının, Orta Anadolu bölgesi kan merkezlerine başvuran kan donörlerinde yaptıkları çalışmada ise, ELISA yöntemi ile

BNV seropozitiflik oranı %1 (25/2.516) oranında saptanmıştır. Çalışmamızda, ELISA ile %1.6 olarak tespit edilen BNV IgG pozitiflik oranı, bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

BNV enfeksiyonlarının serolojik tanısında, hasta serumunda özgül IgG ve IgM antikorlarının araştırılması, yaygın olarak kullanılan bir uygulamadır (3, 5, 99). Ancak BNV IgM antikorlarının bir yıldan uzun süre kalıcı olabilmesi, akut enfeksiyonun geçirilme zamanı ile ilgili bilgi edinmede sorun oluşturabilmektedir (100-103). Bu durumda IgG avidite testleri ek bir yöntem olarak önerilmektedir (119). BNV IgG aviditesinin tespiti, son zamanlarda ya da önceden kazanılmış BNV enfeksiyonu ayırımının yapılmasında tanısallık sağlamaktadır. Levett ve arkadaşlarının çalışmasında, BNV enfeksiyonunun farklı dönemlerinde (0-10 gün, 10-45 gün, 45-180 gün) alınan serum örneklerine iki farklı yöntemle (IFA ve ELISA) IgG avidite testleri uygulanmıştır (119). Bu araştırmacılar, enfeksiyonun ilk 1.5 aylık döneminde IFA ile %95, ELISA ile %86 oranında düşük aviditeli IgG antikorları tespit etmiş; enfeksiyondan 6 ay sonra alınan örneklerde ise her iki test yöntemiyle de yüksek aviditeli BNV IgG antikorlarını %100 olarak saptamışlardır (119). Çalışmamızda, ELISA testi ile BNV IgG pozitif bulunan 19 donörün serum örneklerine, virus ile karşılaşma zamanının öngörülebilmesi amacıyla BNV IgG avidite testi uygulanmış ve örneklerin tümünde yüksek aviditeli IgG pozitifliği (Aİ aralığı: %67.8-99.2, ortalama Aİ: %86.7) saptanmıştır (Şekil 4.2, Tablo 4.9). Bu sonuç, donörlerin BNV ile karşılaşmasının 6 ay ve daha öncesinde olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışmamıza katılmayı kabul eden donörlere yaş, meslek, sürekli yaşanılan yer ve arboviral enfeksiyonlar açısından muhtemel risk faktörlerini belirleyici 9 sorudan oluşan "Kan Bağışçısı Bilgi Formu" (Ek 3) okunarak verilen cevaplar kaydedilmiştir. Çalışmaya alınan 1200 kan donöründen 295'i (%24.5) son altı ay içerisinde iş ya da hobi gereği kırılık, çalılık veya ormanlık alanlarda bulunduğunu ifade etmiş, bu donörlerin 6'sının (%2) serumunda ELISA ile BNV IgG pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4.4). Bilindiği gibi açık alanlar, artropod kaynaklı enfeksiyonların kazanılması açısından en etkili risk bölgeleridir. Bu nedenle, sivrisineklerde BNV varlığını araştıran saha çalışmaları da sörveyans açısından

önem taşımaktadır. Ancak ulaşılabildiği kadarıyla, ülkemizde değişik sivrisinek türleri üzerinde yapılan çalışmalarda BNV pozitifliği tespit edilememiştir (87, 132).

Büyük ölçüde kuşlardan beslenen ornitofilik sivrisinekler, BNV'nun ana vektörleridir. Virusun kenelerden de izole edildiğinin bildirilmesine rağmen, vektör olarak rolleri açık değildir (10, 29). Bu konuyla ilgili olarak, kenelerin endemik bölgelerde virusun devamlılığında rol oynayabileceği, ancak epidemiler sırasında vektör olarak önem taşımadığı düşünülmektedir (30). Çalışmamıza katılan kan donörlerinden %3.7'si (45/1200), kendisi veya bir yakınının yaşamı boyunca en az bir kere kene tarafından ısırıldığını ifade etmiş, %7.6'sı (92/1200) ise yaşadığı veya çalıştığı alanda sivrisinek veya kene gibi böceklerle karşılaştığını belirtmiştir. Bu donörlerin BNV IgG sonuçları incelendiğinde, her iki grupta da birer donörün (sırasıyla; %2.2 ve %1.1) BNV IgG antikoru yönünden pozitif olduğu izlenmiştir (Tablo 4.4).

Batı Nil virusunun yeni girdiği alanlarda duyarlı kuşların ölümüne yol açması ve bir bölgede kuş popülasyonlarındaki ölüm oranının artışı, BNV aktivitesinin izlenmesinde, olası bir epideminin öngörüsünde ve sürveyans çalışmalarında yol gösterici rol oynamaktadır (28, 29, 31, 32). 1999'daki New York şehri salgınında, kuş ölümlerinin olağandışı boyutlarda olması, etkenin tanımlanması yönünde önemli bir ipucu olmuştur. Zira önceleri epidemiden sorumlu olduğu düşünülen St.Louis ensefaliti (SLE) virusunun kuşları enfekte etme özelliğinin olmaması, çalışmaların başka bir arbovirus üzerinde yoğunlaşmasını sağlamıştır (7). Benzer olarak, BNV'nun Eski Dünya ülkelerinde oluşturduğu epidemilerde de eş zamanlı kuş ölümleri rapor edilmiştir (133). Bu verilere dayanarak çalışmamızda sorgulanan kan donörlerinin %2.5'i (30/1200) yaşadığı veya çalıştığı alanda ölü kuşlara ya da başka kanatlı hayvanlara rastladığını belirtmiş ve bunlardan birinde (%3.3) BNV ELISA IgG pozitifliği tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Memeliler, virusun ekosistemdeki iletim döngüsünü sağlamada kuşlardan daha az önem taşımaktadırlar. Ancak yine de at, kedi, köpek, fare, tavşan, keçi ve sığır gibi hayvanların, virusun gerek kırsal (*sylvatic*) gerekse kentsel (*urban*) döngüsü sırasında enfekte olabileceği bilinmektedir (5, 133). Çalışmamıza katılan

kan donörleri, yaşadığı veya çalıştığı alanda evcil hayvan, kümes hayvanı ya da binek hayvanı varlığı yönünden de sorgulanmış ve %8'inden (97/1200) olumlu yanıt alınmıştır. Ancak bu donörlerin hiç birisinde ELISA ile BNV IgG antikorları saptanmamıştır (Tablo 4.4). Ayrıca, son 6 hafta içinde yabani bir fare ile temasının olduğunu belirten bir donörde; uzun süreli yurtdışında bulunduğunu (özellikle BNV'nun endemik olduğu Afrika, Asya, Avrupa ve Amerika ülkeleri) ifade eden 21 donörde ve yurtdışına gidişi sırasında ya da orada bulunduğu süre içinde sarı humma ve kene ensefaliti aşısı olduğunu belirten üç donörde BNV IgG antikorları ELISA yöntemi ile negatif sonuç vermiştir. Diğer flavivirus aşılı ile aşılanan kişilerde çapraz reaksiyonlara bağlı olarak serolojik testlerde pozitif sonuç alınma olasılığı mevcuttur (116). Bizim çalışmamızda sarı humma ve kene ensefaliti aşısı olduğunu ifade eden üç donörde negatif sonuç alınması; (a) bu kişilerde çapraz reaktivite gösteren antikorların bulunmaması, (b) aşılanma zamanına bağlı olarak antikorların saptanamayacak düzeylere gerilemiş olması ve (c) kişilerin oldukları aşı hakkında yeterli bilgiye sahip olmamasından kaynaklanmış olabilir.

Batı Nil virusunun, sivrisinek ısırmasıyla gerçekleşen doğal bulaşının yanı sıra, anne sütü ile beslenme ve enfekte hayvanlarla yakın temas ile de bulaştığı bildirilmektedir (9, 63, 65, 66). Çalışmamıza katılan donörler, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri tüketimi konusunda da sorgulanmış ve bu soruya olumlu yanıt veren donörlerden (147/1200; %12.2) dördünde (4/147; %2.7) BNV ELISA IgG pozitifliği belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Diğer taraftan, ELISA ile BNV IgG antikor pozitifliği saptanan 19 kan donörünün risk faktörleri değerlendirildiğinde; sekizinde (%42.1) açık alanda bulunma, sivrisinek/kene teması ve çiğ süt/süt ürünleri tüketme öyküsü gibi risk faktörlerinin bulunduğu izlenmiş, buna karşın 11'inde (%57.9) herhangi bir risk faktörünün mevcut olmadığı görülmüştür (Tablo 4.3). Ancak bu sonuç ihtiyatla değerlendirilmelidir; zira bir kişinin hayatı boyunca bir sivrisinek tarafından ısırılmamış olması –özellikle de ülkemiz koşullarında- pek olası görünmemektedir. Dolayısıyla negatif yanıt veren bu donörlerin, risk faktörü mevcudiyeti açısından sorgulanmaları sırasında, sivrisinek ısırığını beyana değer bulmama, göz ardı etmiş ya da unutmuş olma olasılığı daha yüksek görünmektedir.

Batı Nil virus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında en yaygın olarak kullanılan yöntemler serolojik testlerdir. Bu amaçla sıklıkla ELISA yönteminin tercih edilmesine karşın, IFA ve HI testleri de uygulanmaktadır (95, 99). Ancak, BNV'na karşı bu yöntemlerle elde edilen antikor pozitifliği, antijenik olarak yakın ilişkili flaviviruslar (Japon ensefaliti, St.Louis ensefaliti, Dengue, kene ensefaliti, sarı humma virusları) arasındaki çapraz reaksiyonlar yönünden dikkatle değerlendirilmeli ve yalancı pozitifliğin dışlanabilmesi için altın standart yöntem olan PRNT ile doğrulanmalıdır (5, 6, 8, 95, 99, 104). Almanya'da 2004 ve 2005 yıllarında iki farklı bölgede yapılan çalışmada, sırasıyla 14.437 ve 9.976 kan donöründen alınan serum örneklerinde BNV antikor varlığı ELISA yöntemi ile araştırılmış ve %5.9 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (130). Ancak araştırmacılar, bu sonuçları nötralizasyon testi ile doğruladıklarında pozitiflik oranı %0.03'e gerilemiştir (130). Benzer olarak Yunanistan'da 2007 yılında yapılan çalışmada da, sağlık merkezine başvuran 392 kan donörünün altısında (%1.5) ELISA ve IFA yöntemleri ile BNV IgG pozitifliği saptanmış, bunların dördü (%1) nötralizasyon yöntemi ile doğrulanmıştır (134). Ülkemizde Ergünay ve arkadaşları, 2.516 kan donörünün 25'inde (%1) ELISA yöntemi ile BNV IgG seropozitifliği saptamışlar ve bunların 14'ünü (%0.6) PRNT yöntemi ile doğrulamışlardır (94). Yine aynı araştırmacılar, Güney Doğu Anadolu bölgesinde 181 sağlıklı kişinin 29'unda (%16) IFA yöntemiyle BNV IgG pozitifliği tespit etmiş ve bunların 17'sini (%9.5) nötralizasyon testi ile doğrulamıştır (92). Ancak ülkemizde yapılan diğer seroprevalans çalışmalarında, BNV seropozitifliğinin PRNT ile doğrulanmadığı görülmektedir (89, 90, 93). Bunun nedenleri arasında; donanımlı bir viroloji laboratuvarı gereksinimi, canlı virus süşunun temin edilebilme ve uygun hücre kültürlerinde üretilbilme sorunu, nötralizasyon testinin emek-yoğun bir yöntem olması, teknik ekipman ve deneyimli personel eksikliği gibi faktörler sayılabilir.

Bu çalışmada, ELISA yöntemi ile BNV IgG pozitif olarak saptanan donör örneklerinde sonuçların doğrulanması, duyarlılık ve özgüllüğü görece olarak daha yüksek olan IFA ve altın standart olarak kabul edilen PRNT ile yapılmıştır. Çalışmamızda, BNV ELISA IgG pozitif olan 19 serum örneğinin 15'i (%78.9) IFA ile de pozitif sonuç vermiştir (Tablo 4.6). Kalitatif olarak yapılan değerlendirmede, bu

örneklerin yedisi güçlü pozitif, yedisi orta pozitif ve biri zayıf pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4, Tablo 4.5). ELISA ile pozitif, IFA ile negatif sonuç alınan dört örnek incelendiğinde, tümünün kantitatif ELISA değerlerinin düşük olduğu görülmektedir. ELISA yönteminde ≥ 20 RU/ml değerleri pozitif kabul edilmekle birlikte, üç örneğin (no: 6, 15, 19) IgG düzeyleri sırasıyla; 28.3, 25.6 ve 36.4 RU/ml olarak saptanmış, bir örneğin (no: 10) ise sınırda pozitif (17.6 RU/ml) değer verdiği görülmüştür (Tablo 4.6). Buna karşın kantitatif ELISA değerleri ile kalitatif IFA değerleri arasında bir korelasyon olmadığı da dikkati çekmiştir (Tablo 4.6). Bu sonuçlar, IFA yönteminin analitik duyarlılığının ELISA yöntemine göre daha düşük olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda doğrulama testi olarak uygulanan PRNT, flaviviruslar arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle serolojik test sonuçlarının doğrulanmasında, gerek uluslararası literatürde gerekse WHO ve CDC raporlarında referans olarak kabul edilen bir yöntemdir (11, 17, 29, 57, 99, 120, 121, 122, 124). Bu yöntemin prensibi, serum örneklerinde bulunan özgül BNV antikorlarının, virusun zarf (E) glikoproteinlerine bağlanarak onları kapatması ve böylece hücrelere tutunmasını ve girişini önlenmesine (nötralizasyon) dayanmaktadır. Bunun sonucu olarak hücre kültürlerinde virusun oluşturacağı sitopatik etki odakları (plak) azalacak ya da hiç oluşmayacaktır. Bu çalışmada, ELISA ile BNV IgG pozitif bulunan 19 serum örneğinin 1/20 ve 1/40 oranlarında hazırlanan sulandırımıları, standart virus suşu (West Nile virus NY99-4132 strain) ile karıştırılarak tek tabakalı hücre kültürü mikropaklarına inoküle edilmiştir (Şekil 3.6). Enfektif viral partikül sayısı (*plaque forming unit*, pfu) daha önceden bilinen standart virus suşu (West Nile virus NY99-4132 strain), Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş ve laboratuvarımızda Vero hücre kültürü sisteminde üretilmiştir (Şekil 3.5). Sonuçların değerlendirilmesi, virus kontrol çukurlarından elde edilen ortalama plak sayısı ile serum örneklerinin bulunduğu çukurlardaki ortalama plak sayısının karşılaştırılmasıyla yapılmış ve virus kontrol çukurundaki plak sayısının %80 ve daha yüksek oranda azalmasına yol açan en yüksek serum sulandırımı, o örneğin BNV nötralizan antikor titresi (PRNT₈₀) olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.7, Tablo 3.1). PRNT yöntemi ile çalışılan

19 serum örneğinin 10'undan (%52.6) pozitif sonuç alınmış ve bu 10 örneğin dokuzu 1/40, biri ise 1/20 titrede pozitif sonuç vermiştir (Tablo 4.6, Şekil 4.6). Dolayısıyla 3, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 ve 19 no'lu donörlerde BNV antikor varlığı doğrulanmıştır (Tablo 4.6).

Artropodlarla bulaşan flaviviruslar (Japon ensefaliti, St.Louis ensefaliti, kene ensefaliti, Dengue, sarı humma) arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle, bu virusların endemik olduğu bölgelerde, doğal enfeksiyon ya da aşılama sonucu oluşan antikorlar, BNV serolojik testlerinde yalancı pozitifliğe yol açabilirler (120). Çalışmamızda ayrıca, ELISA ile BNV IgG pozitifliği saptanan örneklerde, Dengue (DENV), kene ensefaliti (TBEV) ve sarı humma (YFV) viruslarına karşı IgG varlığının da araştırılarak, bu olasılığın dışlanması amaçlanmıştır. Ancak çok sınırlı coğrafi dağılım gösteren ve Amerika ve Uzak Doğu bölgelerinde endemik olan St.Louis ensefaliti ve Japon ensefaliti viruslarının ülkemizdeki varlığına dair hiçbir veri olmadığından bu viruslar göz ardı edilmiştir. BNV ELISA IgG pozitif 19 donör serumunun üçünde DENV IgG, ikisinde ise YFV IgG antikor pozitifliği saptanırken örneklerin hiçbirisinde TBEV IgG pozitifliği belirlenmemiştir (Tablo 4.8). Bu sonuçlara göre, BNV ve DENV IgG pozitif bulunan üç örnek (no: 5, 7 ve 18) ile BNV ve YFV IgG pozitif bulunan iki örnekte (no: 5 ve 11), olası çapraz reaksiyon varlığı düşünülmüştür. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde; 7 ve 11 no'lu örneklerde BNV nötralizasyon testinin pozitif sonuç vermesi, çapraz reaktivitenin sırasıyla DENV ve YFV IgG testlerinin aleyhine olduğunu vurgulamaktadır (Tablo 4.8). Buna karşın 5 no'lu örnekte her üç virusa karşı da IgG pozitifliğinin saptanması ve BNV nötralizasyon testinin negatif olması, çapraz reaksiyonların hangi virusun lehine ya da aleyhine değerlendirileceği konusunu şüpheyne düşürmektedir. Bu durum, DENV veya YFV antikorlarının nötralizasyon testi ile araştırılması ile açıklık kazanabilir; ancak çalışmamızın amacına dahil olmadığından, bu viruslar için PRNT testi uygulanmamıştır. Benzer yorum, 18 no'lu örnek için de geçerli olmasına rağmen, bu örnekte ELISA ve IFA BNV IgG değerlerinin yüksek pozitif olması [sırasıyla; 66.2 RU/ml ve (+++)], çapraz reaksiyonun DENV IgG testi aleyhine olabileceğini düşündürmektedir (Tablo 4.6). 15 no'lu donör ise, sadece ELISA yöntemi ile düşük düzey (25.6 RU/ml) BNV IgG pozitifliği göstermiş ve bu

sonuç, BNV ELISA IgG testinin özgüllük sorunu olarak yorumlanmıştır (Tablo 4.8). Nitekim bu testin özgüllüğü, üretici firma tarafından %96.9 olarak verilmektedir.

Çalışmamızda DENV ve YFV seropozitifliği, tüm kan donörleri dikkate alındığında, sırasıyla %0.25 (3/1200) ve %0.16 (2/1200) olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde bu viruslar ile ilgili çalışmalar yok denilecek kadar azdır. Serter'in 1980 yılındaki çalışmasında, Ege Bölgesindeki bireylerden toplanan serum örneklerinde DENV serotip 1-3 pozitifliği sırasıyla %53, %2.1 ve %0.9 oranlarında tespit edilmiş ve sonuçlar nötralizasyon ile doğrulanmıştır (90). Aynı çalışmada YFV seropozitifliği %9.7 oranında saptanmış, ancak nötralizasyon testi ile doğrulama yapılmamıştır (90). Ergünay ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise, orta/kuzey Anadolu bölgesi kan donörlerinde anti-DENV (tip 1-4) IgG antikorları örneklerin %0.9'unda (21/2435), anti-YFV IgG antikorları ise %0.6'sında (9/1502) pozitif olarak saptanmıştır (135). Bu araştırmacılar, özellikle DENV-2 reaktivitesine dikkat çekmişler, ancak YFV antikor pozitifliğini nötralizasyon ile doğrulayamadıklarından, bu durumun ülkemizde DENV ya da antijenik olarak benzer bir flavivirusun olası varlığına işaret ettiğini belirtmişlerdir (135).

Çalışmamızın en ilginç ve yoruma açık bulgusu, ELISA ve IFA ile BNV IgG pozitif bulunan ve diğer flaviviruslarla çapraz reaksiyon vermeyen yedi donöre ait (örnek no: 1, 2, 4, 5, 9, 12 ve 17) serum örneğinde PRNT ile negatif sonuç alınmış olmasıdır (Tablo 4.8). Bu durum, bu örneklerde ELISA ve IFA ile saptanan antikorların nötralizan özellikte olmayan (*non-neutralizing antibody*) antikorlar olduğunu düşündürmektedir. Benzer sonuçlar Niedrig ve arkadaşlarının çalışmasında da bildirilmiştir (136). Bizim çalışmamızda kullanılan ELISA yönteminde, çukurların kaplı olduğu antijenler BNV ile enfekte hücre lizatından oluşmaktadır. Yine çalışmamızda kullandığımız IFA yönteminde, lam üzerine fikse edilen substratlar da BNV ile enfekte edilmiş hücre kültürü örnekleridir. Dolayısıyla bu yöntemlerde, BNV antikorları ile birleşen antijenler, daha ziyade virusun replikasyonu sırasında hücre içinde biriken kapsid (C) ve membran (M) antijenleridir. Oysa nötralizan antikorlar, virusun zarf glikoproteinlerine (E) karşı oluşan antikorlardır. PRNT yönteminde plak oluşumunun azalması ya da inhibisyonu, bu antikorların serbest virusun yüzey glikoproteinlerine bağlanması

sonucu hücreleri enfekte etmesini önlemesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, ELISA ve IFA yöntemleri ile saptanan pozitif sonuçların, PRNT yöntemi ile yüksek uyum göstermesi doğal olarak beklenen bir sonuç değildir (136).

Ülkemizde BNV ile ilgili olarak uzun zamandır bilinen gerçeklere karşın, klinik BNV olgularının bildirildiği ilk resmi açıklama T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından Ağustos 2010 tarihinde yapılmıştır (88). Manisa ilinde ortaya çıkan nedeni belirlenemeyen menenjit benzeri 16 olgunun serum ve BOS örnekleri Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü, Viroloji Bölümüne gönderilmiş ve bu olguların üçünde BNV enfeksiyonu saptanmıştır (yayınlanmamış veri). Daha sonra Sakarya, İzmir, Aydın ve Isparta'dan toplam dört yeni olgu daha Batı Nil ateşi olarak tanımlanmıştır. Batı Nil enfeksiyonu tanısı konulan bu yedi hastadan üçü kaybedilmiştir (88). Ege bölgesinde 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 (82). Ayrıca son yıllarda ortaya çıkan epidemilerde BNV'nun virülansında artışın olması ve klinik BNV enfeksiyonlarının daha ciddi seyretmesi, ileri tarihlerde bu virusun ülkemiz için de büyük sorunlar oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran donörlerde BNV IgG seropozitiflik oranı ELISA yöntemi ile %1.6 (19/1200) olarak saptanmış ve PRNT yöntemi ile %0.8 (10/1200) olarak doğrulanmıştır. Çalışmamızda, kan donörlerinde saptanan bu düşük BNV IgG pozitiflik oranı, donörlerin BNV açısından rutin olarak taranmasının, şu an için gerekli olmadığını vurgulamaktadır. Buna karşın seçilmiş sağlıklı bir gruptan elde edilen sonuçlarımız, BNV enfeksiyonlarının ülkemizde süreyans ve kontrol programları içerisine dahil edilebilir özellikte olduğunu işaret etmektedir. Çalışmamızın verilerinin, Türkiye'de BNV seroprevalansı ile ilgili gerçek oranları yansıtması açısından değerli olduğu ve ülkemizde yeni oluşturulmaya başlanılan strateji planlarına katkı sağlayacağı ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. Neurotropic virus isolated from blood of native of Uganda. *Am J Trop Med.* 1940; 20: 471-92.
2. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet.* 2002; 2: 519-29.
3. Reiter P. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.* 2010; 15: 19508.
4. Solomon T, Ooi MH, Beasley DWC, Mallewa M. West Nile encephalitis. *BMJ* 2003; 326: 865-9.
5. Sampathkumar P. West Nile Virus: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78: 1137-44.
6. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine.* 2007; 25: 5563-76
7. 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: 1807-14.
8. 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.
9. 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.* 2005; 11: 1174-9.
10. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 225-31.
11. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication, pp: 991-1041. In: Knipe DM, Howley PM, et al. (Eds), *Fields Virology*. 4th ed, 2001. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins.

12. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 618-23.
13. Brault AC. Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res.* 2009; 40:43.
14. Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology.* 2003; 315: 381-8.
15. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science.* 2003; 302: 248.
16. Brinton MA. The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 371-402.
17. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 171-81.
18. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* 2009; 81: 6-15.
19. Petersen LR, Roehrig JT. West Nile Virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 611-4.
20. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 19111-6.
21. 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.
22. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol.* 2004; 78: 10543-55.

23. Davis CW, Nguyen HY, Hana SL, Sanchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol*. 2006; 80: 1290-301.
24. Chu JJ, Choo BG, Lee JW, Ng ML. Actin filaments participate in West Nile (Sarafend) virus maturation process. *J Med Virol*. 2003; 71: 463-72.
25. Holmes DA, Purdy DE, Chao DY, Noga AJ, Chang GJ. Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3227-36.
26. Spohn G, Jennings GT, Martina BE, Keller I, Beck M, Pumpens P, et al. A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice. *Virol J*. 2010; 7: 146.
27. Chu JJH, Ng ML. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *J Gen Virol*. 2003; 84: 3305-14.
28. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27: 343-55.
29. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 147-56.
30. World Health Organization. The vector-borne human infections of Europe. WHO, Geneva, Switzerland, 2004. <http://www.euro.who.int/document/e82481.pdf>
31. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Inf Dis*. 2002; 8: 392-7.
32. Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, et al. West Nile fever in Israel 1999–2000: from geese to humans. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 951: 127-42.

33. Trock ES, Meade JB, Glaser LA, et al. West Nile Virus outbreak among horses in New York State 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 745-9.
34. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand PJ, Zeller H. West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 692-6.
35. Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flavivirus. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81: 196-206.
36. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol.* 2003; 77: 2578-86.
37. Fredericksen BL, Smith M, Katze MG, Shi PY, Gale M. The host response to West Nile virus infection limits spread through the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway. *J Virol.* 2004; 78: 7737-47.
38. Samuel MA, Diamond MS. Type I IFN protects against lethal West Nile Virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol.* 2005; 79: 13350-61.
39. Gilfoy FD, Mason PW. West Nile virus-induced IFN production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol.* 2007; 81: 11148-58.
40. Keller BC, Fredericksen BL, Samuel MA, Mock RE, Mason PW, Diamond MS, et al. Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence. *J Virol.* 2006; 80: 9424-34.
41. Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev.* 2008; 225: 212-25.
42. Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, Diamond MS. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol.* 2006; 80: 5338-48.

43. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004; 10: 1366-73.
44. Arjona A, Foellmer HG, Town T, Leng L, McDonald C, Wang T, et al. Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J Clin Invest.* 2007; 117: 3059-66.
45. Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 17140-5.
46. Diamond MS, Sitati E, Friend L, Shrestha B, Higgs S, Engle M. Induced IgM protects against lethal West Nile virus infection. *J Exp Med.* 2003; 198: 1-11.
47. Mehlhop E, Whitby K, Oliphant T, Marri A, Engle M, Diamond MS. Complement activation is required for the induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol.* 2005; 79: 7466-77.
48. Sitati E, Diamond MS. CD4⁺ T cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J Virol* 2006; 80: 12060-9.
49. Shrestha B, Diamond MS. The role of CD8⁺ T cells in the control of West Nile virus infection. *J Virol* 2004; 78: 8312-21.
50. Diamond MS. Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000452.
51. Suthar MS, Gale M Jr, Owen DM. Evasion and disruption of innate immune signalling by hepatitis C and West Nile viruses. *Cell Microbiol.* 2009; 11:880-8.
52. Guo JT, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha-interferon. *J Virol.* 2005; 79: 1343-50.
53. Evans JD, Seeger C. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signalling. *J Virol.* 2007; 81: 11809-16.

54. Liu WJ, Wang XJ, Mokhonov VV, Shi PY, Randall R, Khromykh AA. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol.* 2005; 79: 1934-42.
55. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 173-9.
56. Sejvar JJ, Leis AA, Stokic DS, Van Gerpen JA, Marfin AA, Webb R, et al. Acute flaccid paralysis and West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 788-93.
57. Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin AD, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, et al. West Nile encephalitis in Israel 1999: the New York connection. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 659-61.
58. Weiss D, Carr D, Kellachan J, et al; West Nile Virus Outbreak Response Working Group. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 654-9.
59. Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigations of West Nile virus infections in recipients of organ transplantation and blood transfusion-Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 879.
60. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, et al; West Nile Virus in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2196-203.
61. Centers for Disease Control and Prevention. Investigations of West Nile virus infections in recipients of blood transfusions. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 973-74.
62. Food and Drug Administration. Revised recommendations for the assessment of donor suitability and blood and blood product safety in cases of known or suspected West Nile virus infection. 2003. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/wnvguid.pdf>

63. Centers for Disease Control and Prevention. Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding-Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 877-8.
64. Centers for Disease Control and Prevention. Intrauterine West Nile virus infection-New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 1135-6.
65. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired West Nile virus infections-United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 1133-5.
66. Hayes EB, Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med.* 2006; 57: 181-94.
67. Emig M, Apple DJ. Severe West Nile virus disease in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 289-92.
68. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus activity-United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57: 720-3.
69. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 951: 117-26.
70. Triki H, Murri S, Le Guenno B, Bahri O, Hili K, Sidhom M, Dellagi K. West Nile viral meningoencephalitis in Tunisia. *Med Trop (Mars)* 2001; 61: 487-90.
71. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 306-9.
72. Soliman A, Mohareb E, Salman D, Saad M, Salama S, Fayez C, et al. Studies on West Nile virus infection in Egypt. *J Infect Public Health.* 2010; 3: 54-9.
73. Ceianu CS, Ungureanu A, Nicolescu G, et al. West nile virus surveillance in Romania: 1997-2000. *Viral Immunol.* 2001; 14: 251-62.
74. Platonov AE. West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951: 102-16.
75. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in

- relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res.* 2008; 103: S45-53.
76. Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, et al. West Nile outbreak in horses in southern France: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 777-82.
 77. Mailles A, Dellamonica P, Zeller H, Durand JP, Zientara S, Goffette R, et al. Human and equine West Nile virus infections in France, August-September. *Euro Surveill Wkly.* 2003; 7: 43.
 78. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill.* 2008; 27: 13.
 79. Monaco F, Lelli R, Teodori L, Pinoni C, Di Gennaro A, Polci A, et al. Re-emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses and Public Health.* 2009; doi: 10.1111/j.1863-2378.009.01245.x.
 80. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnár Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V, Kaszas K. West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008. *Euro Surveill.* 2008; 13; pii: 19030.
 81. Morgan D. Control of arbovirus infections by a coordinated response: West Nile Virus in England and Wales. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48: 305-12.
 82. 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.
 83. 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: 2333-7.
 84. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6: 319-28.
 85. Garmendia AE, Van Kruiningen HJ, French RA. The West Nile virus: its recent emergence in North America. *Microbes Infect.* 2001; 3: 223-9.

86. Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, et al. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 2007; 39: 1162-6.
87. Özkan D. İstanbul'da Batı Nil virus taraması. Marmara Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 2006, İstanbul.
88. Sağlık Bakanlığı Basın Açıklaması.
<http://www.saglik.gov.tr/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFF88F742D0D711251E9C66FF13E126BBA>
89. Meço O. West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul.* 1977; 11: 3-17.
90. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey, pp: 155-61. In: Vesenjok-Hirjan J, Calisher C (Eds). *Arboviruses in the Mediterranean Countries.* 1980, Suppl 9. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
91. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect.* 2006; 134: 826-9.
92. 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.
93. Hızal K, Yenicesu İ, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan I, Kalkancı A, Dilsiz G. Sağlıklı kan vericilerinde Batı Nil virusunun araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44: 425-30.
94. 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; 10: 771-5.
95. 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>

96. Martin DA, Biggerstaff BJ, Allen B, Johnson AJ, Lanciotti RS, Roehrig JT. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 544-9.
97. Zhang W, Wu J, Li Y, Li F, Njoo H. Rapid and accurate in vitro assays for detection of West Nile virus in blood and tissues. *Transfus Med Rev.* 2009; 23: 146-54.
98. The New York State Department of Health. Guidelines and recommendations for health care providers. 2003. www.nyc.gov/html/doh/html/wnv/wnvhcp.shtml
99. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemic/epizootic West Nile virus in the United States: revised guidelines for surveillance, prevention, control, 2003. http://www.cdc.org/ncidod/dubid/westnile/lab_guidance.htm
100. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1823-6.
101. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:376-9.
102. 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: 289-91.
103. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virus and antibody dynamics in acute West Nile virus infection. *J Infect Dis.* 2008; 198: 984-93.
104. Martin DA, Noga A, Kosoy O, Johnson AJ, Petersen LR, Lanciotti RS. Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile virus and St. Louis

encephalitis virus infections during the 2002 West Nile virus epidemic in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 1130-3.

105. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsay MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4066-71.
106. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 257-63.
107. Hunt AR, Hall RA, Kerst AJ, Nasci RS, Savage HM, Panella NA, et al. Detection of West Nile virus antigen in mosquitoes and avian tissues by a monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2023-30.
108. Jordan I, Briesse T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1214-7.
109. Anderson JF, Rahal JJ. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 107-8.
110. Chan-Tack KM, Forrest G. Failure of interferon alpha-2b in a patient with West Nile virus meningoencephalitis and acute flaccid paralysis. *Scand J Infect Dis.* 2005; 37: 944-6.
111. Lewis M, Amsden JR. Successful treatment of West Nile virus infection after approximately 3 weeks into the disease course. *Pharmacotherapy.* 2007; 27: 455-8.
112. Shimoni Z, Niven MJ, Pitlick S, Bulvik S. Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 759.

113. Hamdan A, Green P, Mendelson E, Kramer MR, Pitlik S, Weinberger M. Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis. *Transpl Infect Dis.* 2002; 4: 160-2.
114. Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinson S, Segal S, Rager-Zisman B. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virus infection in mice. *J Infect Dis.* 2003; 188: 5-12.
115. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for human West Nile virus disease - United States, 1999-2008. *MMWR Surveill Summ.* 2010; 59: 1-17.
116. Hall RA, Khromykh AA. West Nile virus vaccines. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4: 1295-305.
117. Monath TP, Liu J, Kanesa-Thasan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, et al. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 6694-9.
118. Pletnev AG, Claire MS, Elkins R, Speicher J, Murphy BR, Chanock RM. Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology.* 2003; 314: 190-5.
119. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M, Steinhagen K, et al. Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5873-5.
120. Shi PY, Wong SJ. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3: 733-41.
121. Beaty BJ, Calisher CH, Shope RS. Arboviruses, pp: 797-856. In: Schmidt NJ, Emmons RW (Eds), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections.* 6th ed, 1989. Washington DC: American Public Health Association.

122. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol.* 2003; 84 (Pt 10): 2807-17.
123. Schmidt NJ. Cell culture procedures for diagnostic virology, pp: 51-100. In: Schmidt NJ, Emmons RW (Eds), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections.* 6th ed, 1989. Washington DC: American Public Health Association.
124. World Health Organization. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO. Geneva, Switzerland. 2007. www.who.int/vaccines-documents/
125. Euroimmun. Applications: Antibodies against emerging viruses: Indirect immunofluorescence test and Microplate ELISA: Anti-TBE Virus, Anti-West Nile Virus, Anti-Dengue Virus. <http://www.euroimmun.com>
126. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Sener B, Lederer S, Steinhagen K, Haşçelik G, Pinar A, Ozkul A, Us D. Investigation of West Nile virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44: 255-62.
127. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 2003; 349: 1236-45.
128. Centers for Disease Control and Prevention. Detection of West Nile virus in blood donations-Puerto Rico, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57: 577-580.
129. Cameron C, Reeves J, Antonishyn N, Tilley P, Alport T, Eurich B, et al. West Nile virus in Canadian blood donors. *Transfusion* 2005, 45: 487-91.
130. Pfleiderer C, Blümel J, Schmidt M, Roth WK, Houfar MK, Eckert J, et al. West Nile virus and blood product safety in Germany. *J Med Virol.* 2008; 80: 557-63.

131. Koppelman MH, Sjerps MS, de Waal M, Reesink HW, Cuypers HT. No evidence of West Nile virus infection in Dutch blood donors. *Vox Sang* 2006; 90: 166-9.
132. Ozer N, Ergünay K, Simsek F, Kaynas S, Alten B, Caglar SS, Ustacelebi S. West Nile virus studies in the Sanliurfa Province of Turkey. *J Vector Ecol.* 2007; 32: 202-6.
133. Hubaiek Z, Halouzka J. West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 643-50.
134. Papa A, Perperidou P, Tzouli A, Castilletti C. West Nile virus neutralizing antibodies in humans in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10: 655-8.
135. Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Litzba N, Niedrig M, Pınar A, Us D. Orta/Kuzey Anadolu Bölgesi kan donörlerinde Dengue virus ve sarı humma virus seropozitifliğinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44: 415-24.
136. Niedrig, M, Sonnenberg, K, Steinhagen, K, Paweska, JT. Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *J Virol Methods.* 2007; 139: 103-5.

EK 1: Donör Formu (2 sayfadır)
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HASTANELERİ
Kan Merkezi
DONÖR FORMU

Kan Merkezimize Hoş Geldiniz,

Aşağıdaki sorular kan vericisi ve kan alacak olan kişiyi korumak amacıyla düzenlenmiştir. Unutmayın ki verdiğiniz kan korumasız, şuuru kapalı, kanı reddetme şansı olmayan masum bir hastaya ya da yeni doğmuş bir bebeğe verilebilir. Öneğin AIDS testiniz negatif olsa bile AIDS virüsü taşıyor olabilir, kendinizi iyi hissetseniz dahi bu virüsü bulaştırabilirsiniz. Formu doldurduğunuzda kafanızda kan verme konusunda hala şüpheleriniz varsa kimseye bir açıklama yapmadan kan merkezini terkedebilirsiniz veya kan merkezi doktoruyla özel olarak görüşebilirsiniz. Teşekkür ederiz.

	EVET	HAYIR		EVET	HAYIR
1. Bugün kendinizi kan verecek kadar iyi ve sağlıklı hissediyor musunuz?	☐	☐	24. Son 1 yıl içinde kuduz aşısı oldunuz mu? Sahipsiz bir köpek veya şüpheli bir hayvan tarafından ısırıldınız mı?	☐	☐
2. Bugüne kadar size kan vermemeniz gerektiği söylendi mi?	☐	☐	25. Bugüne kadar pıhtılaşma (hemofili gibi) hastalığı nedeniyle faktör konsantresi kullandınız mı? Böyle bir uygulama içerisinde olan bir şahısla 1 kez dahi olsa cinsel ilişkiye girdiniz mi?	☐	☐
3. Hastane, doktor, hemşire, iğne, kan tutma vb. korkularınız var mı?	☐	☐	26. Son 1 yıl içinde frengi (sifiliz) testiniz pozitif oldu mu veya bu süre içinde sifiliz, bel soğukluğu hastası oldunuz mu ya da tedavi gördünüz mü?	☐	☐
4. Son 2-3 ay içinde kan veya kan ürünü (plazma, trombosit, vb.) verdiniz mi?	☐	☐	27. Bugüne kadar size büyüme hormonu (growth hormon) verildi mi?	☐	☐
5. Son 5 gün içinde Aspirin veya benzeri bir ilaç kullandınız mı?	☐	☐	28. Verem hastalığı geçirdiniz mi? Yakın zamanda tekrarladı mı?	☐	☐
6. Son 3 gün içinde diş hekimine gittiniz mi?	☐	☐	29. Sedef hastalığı geçirdiniz mi? Bu hastalık için ilaç kullandınız mı? (Tegison)	☐	☐
7. Son 3 ay içinde dişinizi çektiydiniz mi?	☐	☐	30. Sivilce tedavisi için ağızdan ilaç alıyormusunuz?	☐	☐
8. Son 1 ay içinde aşı yaptırdınız mı?	☐	☐	31. Son 3 yıl içinde sıtma hastalığı geçirdiniz mi? Sıtma hastalığı tedavisi gördünüz mü?	☐	☐
9. Son 1 ay içinde ilaçla veya başka bir şekilde tıbbi tedavi gördünüz mü?	☐	☐	32. Son 1 yıl içinde para karşılığı seks yaptınız mı?	☐	☐
10. Şeker hastası mısınız veya tedavi görüyor musunuz?	☐	☐	33. Bugüne kadar homoseksüel biriyle, son 1 yıl içinde yabancı uyruklu biriyle seks yaptınız mı?	☐	☐
11. İnsülin kullanıyor musunuz?	☐	☐	34. Bugüne kadar uyuşturucu (eroın, esrar, vs.) kullandınız mı? Uyuşturucu kullanan biriyle bir kere bile olsa seks yaptınız mı?	☐	☐
12. Sara (epilepsi) hastası mısınız veya tedavi görüyor musunuz?	☐	☐	35. Damar yolu ile kullanılan ilaç bağımlılığınız var mı?	☐	☐
13. Bugüne kadar kalp, akciğer, böbrek hastalığı geçirdiniz mi?	☐	☐	36. AIDS misiniz? Şüpheleriniz var mı? Bu özellikte olan biriyle bir kere bile olsa seks yaptınız mı?	☐	☐
14. Felç, tekrarlayan bacak damar tıkanıklığı geçirdiniz mi?	☐	☐	37. Kan testi yaptırmak için mi bağışta bulunuyorsunuz?	☐	☐
15. Bugüne kadar hiç sarılık (10 yaş sonrası), karaciğer hastalığı veya iltihabı geçirdiniz mi?	☐	☐	38. Bugüne kadar; beklemediğiniz hızla kilo kaybı, gece terlemesi, deri altında veya üstünde mavi, mor lekeler, 10 günden fazla süren yüksek ateşli hastalık, uzun süreli tedaviye cevap vermeyen ishal, ağzı içinde beyaz lekeler, alışılmadık yaralar oldu mu?	☐	☐
16. Son 1 yıl içinde sarıklık veya hepatitli bir şahısla yakın ilişki içinde oldunuz mu? Size hepatit immünglobülini (serum) verildi mi?	☐	☐	39. Kadınlar için: Son iki ay içinde düşük yaptınız mı? Kürtaj oldunuz mu? Hamile misiniz? Hamilelik şüphesi duyuyor musunuz?	☐	☐
17. Son 1 yıl içinde size kan veya kan ürünü verildi mi? Doku veya organ nakli yapıldı mı?	☐	☐	40. Son 3 gün içinde soğuk algınlığı, grip, boğaz ağrısı geçirdiniz mi?	☐	☐
18. Son 1 yıl içinde önemli hastalık (doktor kontrolünde), ameliyat geçirdiniz mi veya size cerrahi bir müdahalede bulunuldu mu?	☐	☐			
19. Bugüne kadar kanser, kan hastalığı veya kanama problemleri bir hastalık geçirdiniz mi?	☐	☐			
20. Son 6 ay içinde Afrika ülkelerinde bulundunuz mu?	☐	☐			
21. Afrika ülkelerinde 6 aydan uzun süre yaşadınız mı?	☐	☐			
22. İngiltere’de 1980 - 1996 yılları arasında 3 ay, 1980’den sonra 5 yıl bulundunuz mu?	☐	☐			
23. Son 1 yıl içinde kulak veya cildinizin başka bir yerini deldirdiniz mi? Dövme, akupunktur yaptırdınız mı? Kaza ile iğne batması oldu mu?	☐	☐			

Yukarıdaki açıklamaları okudum. Kan vermeme konusunda sakınca olmadığımı düşünüyorum. Kan alacak olan doktor, hemşire, laboratuvar teknisyenlerini kan vermenin oluşturabileceği tıbbi yan etkilerden kanun karşısında kendim veya vekillerim tarafından yapılacak olan her türlü şikayet ve tazminat taleplerinde sorumlu tutmayacağımı bildiririm.

■ Red Nedeni :

Adı, Soyadı :

İmzası :

DONÖR FORMU

I. BÖLÜM	HASTANIN		Donör No : _____ Geçici Dosya No : _____ Tarih :	
	Adı, Soyadı : _____			
	Yattığı Bölüm : _____	Dosya No : _____		
	KAN VERENİN		Doğum Yeri ve Tarihi : _____	
	T.C. Kimlik No : _____		K ☐ E ☐ _____ / _____ / _____	
	Adı, Soyadı : _____		Anne Adı : _____ Baba Adı : _____	
	Eğitim : İlk ☐ Orta ☐ Lise ☐ Yüksek ☐		Meslek : _____	
	Medeni Hali : Evli ☐ Bekar ☐ Diğer _____		Adres : _____	
	Adres : _____		Posta Kodu : _____	
	Ev Tel No : _____		İş Tel No : _____	
GSM Tel No : _____		Faks No : _____		
Nüfus Kağıdı No : _____		Özel Tamlama : _____		
Ehliyet No : _____				
II. BÖLÜM	Kan Grubu : _____ RH () Kan Kullanmadı ☐		Özel Grup : _____	
	_____ 'e kadar kan vermemesi		Nedeni : _____	
	Tam Kan No : _____		Donör No : _____	
	Tam Kan ☐ Taze Donmuş Plazma ☐		Antikor Tarama Testi	
	Eritrosit ☐ Beyaz Küre ☐		VDRL Anti-HIV I-II	
	Trombosit ☐ Kriyopresipitat ☐		Anti-HCV HBsAg	
	Bağış ☐ Kaçınca _____		Antikor Tarama Testi	
	Hastası için ☐ Kaçınca _____		VDRL Anti-HIV I-II	
	Gönüllü Donör Olmayı Sürdürmek İstiyor		Anti-HCV HBsAg	
	Son Bağış Tarihi : _____		Aferezis Tromboferez ☐ Eritroferez ☐	
	Flebotomi ☐ Nedeni _____		Plazmaferez ☐ Lökoferez ☐	
	Alınan Kan Miktarı Standart ☐ Özel _____		Torba Tipi	
	Fizik Muayene : _____		Düşünceler	
	Ağırlık : _____ kg Nabız : _____ dk			
	Vücut Isısı : _____ °C Kan Basıncı : _____ mmHg			
Hb : _____ g/L Htc % _____		Merkez ☐ Askeriye ☐ Gezici Ekip ☐		
HEMŞİRE		DOKTOR		
Adı, Soyadı : _____		Adı, Soyadı : _____		
İmza : _____		İmza : _____		

EK 2: Aydınlatılmış Onam Formu**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ, CERRAHİ ve İLAÇ ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU****AYDINLATILMIŞ (BİLGİLENDİRİLMİŞ) ONAM FORMU
(Toplam 2 sayfadır)*****(Hekimin Açıklaması)***

Bulaştığı kişilerin bir kısmında ateşli hastalık oluşturan Batı Nil Virusu adlı bir virüsle ilgili araştırma yapıyoruz. Araştırmanın ismi **“Kan Donörlerinde Batı Nil Virusu (BNV) Seroprevalansının Saptanması”** dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof. Dr. Osman Özcebe veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından kan bağıışı işlemlerinizi sırasında rutin olarak yapılması gereken testler için alınacak kan örneği, ek laboratuvar testleri ile ileri değerlendirilmeye alınacak ve Batı Nil Virusu olarak adlandırılan ve çoğu kişide belirtisiz olarak geçirilen bir enfeksiyon oluşturan bir virus için tetkik edilecektir. Tetkik sonuçları sizin daha önceden bu virus ile karşılaşmış olduğunuzu ortaya koymaya yöneliktir. Çalışmamızın amacı ülkemizde bu virusun yaygınlığı araştırmaktır.

Bu amaçla yapılacak test için size fazladan bir işlem uygulanmayacaktır. Test, normalde her kan bağıışısının tetkikleri sırasında alınan kan örneğine ek yöntemler uygulanması şeklindedir. Bu nedenle normale göre fazladan bir rahatsızlık hissetmeniz ya da başka bir örnek alınması söz konusu değildir.

Uygulanan test yöntemi tüm dünyada kişilerin bu virüsle önceden karşılaşmış olduğunu göstermek amacıyla yaygın olarak uygulanmaktadır. Çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılan testler ve sonuçları için sizden herhangi bir ücret talep edilmesi söz konusu değildir. Çalışmaya katıldığınız için de size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Test sonuçlarınız, Batı Nil Virusu ile önceden karşılaşma ve doğal olarak aşılama durumunuzu ortaya koyacaktır. Çalışmanın tamamlanmasından sonra araştırmaya katılan doktorlardan veya kan bankası personelinden sonuçlarınızı öğrenebilirsiniz. İsteğiniz dahilinde sonuçlar size yazılı olarak da verilebilecektir. Test sonuçlarınız, isminiz ya da kişisel bilgileriniz gizli kalmak koşulu ile bilimsel amaçlı makalelerde yayınlanarak ve virüsle diğer çalışmalarda kullanılacaktır. Çalışmadan elde edilen veriler bu amaçların dışında kullanılmayacak ve kesinlikle başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. Şeniz Bulut tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Ünitesi'nde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, **Dr. Şeniz Bulut'u, 0533 665 73 73 veya 433 89 32**'ten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

EK 3: Kan Başışısı Bilgi Formu**KAN BAŞIŞISI BİLGİ FORMU****Kan Donörlerinde Batı Nil Virusu (BNV) Seroprevalansının Saptanması**

Adı/Soyadı:.....

Yaşı : Cinsiyeti : ☐ E ☐ K Mesleği :

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

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

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

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

A ☐ Hayır B ☐ Evet (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 ☐ Hayır B ☐ Evet (Hayvanların isimleri) :

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

A ☐ Hayır B ☐ Evet (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 ☐ Hayır B ☐ Evet (..... yıl, ay gün ÖNCE) (Isırılan kişinin yakınlığı hakkında açıklama) :

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

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

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

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

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

A ☐ Hayır B ☐ Evet (Ülke isimleri ve yapılan aşı isimleri) :

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

A ☐ Hayır B ☐ Evet (Açıklamalar, ısırılma durumu):