

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ENFEKSİYONU ÖN TANILI HASTALARIN  
KAN VE BEYİN OMURİLİK SIVISI ÖRNEKLERİNDE BATI NİL  
VİRÜSÜ'NÜN ARAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Zülfü BAYAR**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ**

**ELAZIĞ  
2015**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murat ATMACA

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ \_\_\_\_\_

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca bilgi ve birikimiyle sabırla beni destekleyen, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen değerli hocam, tez danıŐmanım ve sevgili Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a teŐekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim sırasında yetiŐmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. Zülal AŐçı TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK, Prof. Dr. YaŐar DOĞAN, Prof. Dr. Ayhan AKBULUT, Prof. Dr. Ahmet KİZİRGİL, Prof. Dr. Yasemin BULUT'a

AraŐtırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma,

Ve benden desteklerini esirgemeyen değerli eŐim ve aileme sonsuz teŐekkürlerimi takdim ediyorum.

## ÖZET

Dünyada en sık görülen arbovirüslerden biri olan Batı Nil Virüsü (BNV); ilk defa 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil kesiminde izole edilmiştir. Batı Nil Virüsü (BNV), Flaviviridae ailesi, Flavivirüs cinsi ve Japon ensefaliti virüsü (JEV) serokompleksi içerisinde sınıflandırılan, 45-50 nm büyüklüğünde, zarflı ve ikozahedral yapılı bir RNA virüsüdür. Bu virüsün asıl önemi, santral sinir sistemi(SSS)'ni tutarak ensefalit ve menenjitte ve ölüme sebep olmasından ileri gelir.

Batı Nil Virüsü'nün virolojik tanısı, kan ve/veya beyin-omurilik sıvısı (BOS)'nda BNV'ye özgü antikörlerin veya viral nükleik asidin gösterilmesi ile konur.

Yapılan bu çalışmada, SSS enfeksiyonu ön tanılı olup herhangi bir patojen mikroorganizma tespit edilemeyen 47 hastanın, Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen rutin BOS ve kan örneklerinde, ELISA yöntemi ile BNV IgG ve IgM antikorları negatif olarak saptanmıştır. Sadece bir hastanın kan örneğinde BNV IgM şüpheli pozitif saptanmıştır. Bu şüpheli örneğin BOS'u ve kanı Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi ile negatif bulunmuştur. Bu sonuç ELISA yönteminde görülebilen çapraz geaksiyonlara bağlanmıştır. Benzer şekilde tüm örnekler RT-PCR yöntemi ile de çalışılmış BNV'ye ait RNA tespit edilememiştir.

Bizim çalışmaya aldığımız hastaların yaş ortalaması 19 olup, diğer çalışmalara oranla oldukça düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda BNV seropozitifliği yaş ortalaması ile doğru orantılı olarak artmış bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda BNV seronegatifliği büyük ölçüde yaş ortalamasının küçük olmasına bağlanmıştır. Ayrıca PCR ve ELISA'yı beraber dikkate aldığımızda çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, bölgemizde BNV sirkülasyonu aktif olmayıp, ekolojik koşulların değişmesi durumunda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olacaktır. Çalışmamızın bu konuda ülkemiz BNV veri tabanına fayda sağlamasını ümit etmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** BNV, BOS, ELISA, RT-PCR

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF WEST NILE VIRUS IN CEREBROSPINAL FLUID AND BLOOD SAMPLES IN PATIENTS WITH PRELIMINARY INFECTION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND COMPARISON OF CONCLUSION

One of the most common arbovirus in the world of West Nile Virus (WNV) firstly isolated in 1937 in West Nile areas of the Uganda. West Nile Virus (WNV) is classified in the Japanese Encephalitis Virus (JEV) serokompleks of genus flavivirus of family Flaviviridae, enveloped, size 45-50 nm and icosahedral a RNA virus. The main importance of this virus, is to affect of the central nervous system and cause encephalitis, meningitis and death.

Virological diagnosis is investigation of specific West Nile Virus antibodies or viral nucleic acid in blood and / or cerebrospinal fluid.

In this study, WNV IgM and IgG antibodies were determined to be negative with ELISA methods in Cerebrospinal Fluid (CSF) and blood samples that sent to Central Laboratory of Firat University Hospital as routine 47 patients, undetectable any pathogenic microorganisms, with preliminary infection of central nervous system. In only one blood sample of all patient's samples was found suspicious positive WNV IgM. The CSF and blood samples of this WNV IgM doubtful sample were found negative by RT-PCR method. These result is tied to the cross reaksiyon can be seen in the ELISA method. Similarly, all samples are studied by RT-PCR method and couldn't be detected the RNA belonging to WNV.

The average age of the patients, we take our work, is 19. This was significantly lower than in other studies. WNV seropositivity has increased direct proportion to the average age in the studies. In our study, BNV seronegativity is substantially relationship to the small average age. Also according to the data we obtained in our study with PCR and ELISA, WNV circulation is not active in our region, more comprehensive studies will be needed in the event of a change of ecological conditions. We hope on this issue our work to be benefit of WNV database in our country.

**Keywords:** WNV, CSF, ELISA, RT-PCR

## İÇİNDEKİLER

DEKANLIK ONAYI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO LİSTESİ .....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ .....	IX
KISALTMALAR .....	X
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Genel Bilgiler .....	3
1.1.1. Batı Nil Virüsü'nün Tarihçesi .....	3
1.1.2. Batı Nil Virüsü'nün Sınıflandırılması .....	5
1.1.3. Batı Nil Virüsü'nün Filogenetik Analizi .....	5
1.1.4. Batı Nil Virüsü'nün Genom Yapısı .....	7
1.1.5. Batı Nil Virüsü'nün Viral Proteinleri .....	8
1.1.6. Batı Nil Virüsü'nün Replikasyonu .....	10
1.1.7. Batı Nil Virüsü'nün Doğadaki Yaşam Döngüsü .....	13
1.1.8. Batı Nil Virüsü'nün Patogenezi .....	15
1.1.9. Batı Nil Virüsüne Karşı Gelişen İmmun Yanıt .....	18
1.1.10. Batı Nil Virüsü'nün Bulaşma Yolları .....	20
1.1.10.1. Sivrisinek Isırığı .....	20
1.1.10.2. Kan Transfüzyonu .....	20
1.1.10.3. Organ Nakli .....	21
1.1.10.4. Anne Sütü .....	21
1.1.10.5. Transplasental Geçiş .....	22
1.1.10.6. Laboratuvardan Bulaş .....	22
1.1.11. Risk Grubu .....	22
1.1.12. Klinik Bulgular .....	23
1.1.13. Persistan Enfeksiyon .....	25
1.1.14. Coğrafi Dağılım .....	25
1.1.15. Türkiye'de Durum .....	28
1.1.16. Tanı .....	30
1.1.16.1. Antijen testleri .....	31

1.1.16.2. Serolojik testler .....	31
1.1.16.3. Moleküler testler .....	34
1.1.16.4. Virüs izolasyonu .....	34
1.1.17. Tedavi.....	35
1.1.18. Korunma.....	35
1.1.19. Aşı .....	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	37
2.1. Örneklerinin Çözülmesi .....	38
2.2. ELISA Yöntemiyle BNV IgG ve IgM tipi antikorların Tespiti .....	38
2.2.1. Anti-West Nile Virus IgG ELISA yönteminin çalışma prosedürü .....	38
2.2.2. IgG için Cut-off hesaplanması .....	39
2.2.3. Anti-West Nile Virus IgM ELISA yönteminin çalışma prosedürü.....	39
2.2.4. IgM için Cut-off hesaplanması .....	40
2.3. Real Time PCR Yöntemiyle Batı Nil Virüsü Tespiti.....	40
2.3.1. Kit İçeriği .....	41
2.3.2. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek reaktifler ve ekipmanları.....	41
2.3.3. Sulandırma Protokolü .....	41
2.3.4. RNA ekstraksiyonu .....	42
2.3.5. One Step RT-PCR Protokolü .....	42
2.3.6. One Step Amplifikasyon Protokolü .....	44
2.3.7. Sonuçların yorumlanması.....	44
2.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	44
3. BULGULAR.....	45
4. TARTIŞMA .....	51
5. KAYNAKLAR .....	58
6. ÖZGEÇMİŞ .....	79

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Sulandırma İşleminin Bileşenleri ve Hacimleri .....	41
<b>Tablo 2.</b> Reaksiyon Karışımının Bileşenleri ve Hacimleri.....	42
<b>Tablo 3.</b> Standartlara Göre Kopya Sayısı Hazırlama Çizelgesi .....	43
<b>Tablo 4.</b> Oasig <sup>tm</sup> Onestep 2x RT-Qpcr Mastermix İçin Kullanılan Amplifikasyon Koşulları.....	44
<b>Tablo 5.</b> Kontrollere Göre Sonuçların Yorumlanması .....	44
<b>Tablo 6.</b> Hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılım oranları.....	45
<b>Tablo 7.</b> BOS Laboratuvar Bulguları.....	48
<b>Tablo 8.</b> ELISA sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	499

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Japon Ensefaliti Virüsü serokompleksi (25).....	5
<b>Şekil 2.</b> BNV'nin genetik çeşitliliği (31).....	6
<b>Şekil 3.</b> Batı Nil Virüsü'nün şematik yapısı (A) ve elektron mikroskopik görünümü (B) (21).....	8
<b>Şekil 4.</b> Batı Nil Virüsü'nün genom yapısı ve proteinleri (11).....	9
<b>Şekil 5.</b> Batı Nil Virüsü'nün replikasyon döngüsü (21).....	12
<b>Şekil 6.</b> Batı Nil Virüsü'nün bulaş döngüsü (20).....	14
<b>Şekil 7.</b> Fatal BNV enfeksiyonunda beyin dokusunda nötrofil ve mikroglial infiltrasyonla beraber nöronal nekroz (11).....	17
<b>Şekil 8.</b> Batı Nil Virüsüne karşı gelişen immün yanıt (43).....	19
<b>Şekil 9.</b> Batı Nil Virüsü'nün coğrafi dağılımı, 2003 (14).....	26
<b>Şekil 10.</b> Batı Nil Virüsü'nün serolojik ve viral gösterge grafiği (15).....	33
<b>Şekil 11.</b> Hasta örneklerinin klinik servislere göre dağılım yüzdesi. ....	46
<b>Şekil 12.</b> Hastaların hastaneye yatış tarihlerine göre yıl içindeki dağılımı.....	47
<b>Şekil 13.</b> Hastaların geldiği ile göre dağılımı. ....	48
<b>Şekil 14.</b> Çalışılan örneklerin RT-PCR grafikleri. ....	50

## KISALTMALAR

<b>ALFV</b>	: Alfuy Virus
<b>BNV</b>	: Batı Nil Virüsü
<b>BOS</b>	: Beyin-omurilik sıvısı
<b>CCL5</b>	: Kemokin (C-C motifi) ligandı 5
<b>CCR5</b>	: Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5
<b>CD4</b>	: Cluster of Differentiation 4
<b>CD8</b>	: Cluster of Differentiation 8
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CPCV</b>	: Cacipacore Virus
<b>CSF</b>	: Cerebrospinal Fluid
<b>CXCL10</b>	: C-X-C motifi kemokin 10
<b>CXCR3</b>	: Kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3
<b>DC-SIGN</b>	: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
<b>DC-SIGN-R</b>	: DC-SIGN Receptor
<b>DEET</b>	: N N-dietil-m-toluamid
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>HI</b>	: Hemaglutinasyon inhibisyon
<b>IFA</b>	: Indirekt immünofloresan antikor
<b>IFN</b>	: Interferon
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	: Interferon-alfa
<b>IFN (<math>\alpha/\beta</math>)</b>	: Interferon alfa/beta
<b>IRF-3</b>	: Interferon regulatory factor -3
<b>IRG</b>	: IFN-regulated gene
<b>JAK/STAT</b>	: Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>JEV</b>	: Japon Ensefaliti Virüsü
<b>KOUV</b>	: Koutango Virüs

<b>MAC-ELISA</b>	: IgM-Antibody Captured-ELISA
<b>MDA5</b>	: Melanoma differentiation-associated gene 5
<b>MIF</b>	: Makrofaj inhibe edici faktör
<b>MR</b>	:Manyetik Rezonans görüntüleme
<b>MVEV</b>	: Murray Valley Ensefaliti Virüsü
<b>PCR</b>	: Polimerase chain reaction
<b>PRNT</b>	: Plak redüksiyon nötralizasyon testi
<b>RT-PCR</b>	: Real Time-Polymerase chain reaction
<b>SLEV</b>	: St. Louis ensefaliti virüsü
<b>SSS</b>	: Santral Sinir Sistemi
<b>TLR</b>	: Toll-like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>USUV</b>	: Usutu Virüs
<b>YAOV</b>	: Yaounde Virüs
<b>YF</b>	: Sarı humma (Yellow fever)
<b>WNV</b>	: West Nile Virus

## 1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde Batı Nil Virüsü (BNV)'nü de içinde barındıran arbovirüsler gibi artropod kaynaklı enfeksiyonlar önemli halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkar. Arbovirüs terimi, "arthropod borne" kelimelerinin ilk iki harfinden köken alır ve bu virüslerin artropotlar aracılığıyla bulaşmasını ifade eder. Arbovirüsler; Togaviridae, Flaviviridae ve Bunyaviridae ailelerinde yer alırlar (1). Arbovirüs başlığı altında sınıflandırılan 534 virüsten 134'ü insanda hastalık yapar (2).

Arbovirüslerin asıl önemi, santral sinir sistemi (SSS)'ni tutarak ensefalit ve menenjitte sebep olmalarından ileri gelir (3). Bu virüslerin sebep olduğu santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları; menenjit, ensefalit ve ensefalomiyelitten beyin apsesi, subdural ampiyem, epidural apse, nörit ve intrakraniyal flebite kadar geniş klinik dağılım gösterir. Hızlı ilerleme potansiyeli, kalıcı nörolojik hasar ve maalesef ölüme neden olması ile çoğu zaman acil tanı ve tedavi gerektirir (4-9).

Dünyada en sık görülen arbovirüslerden biri olan Batı Nil Virüsü (BNV); ilk defa 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil kesiminde bir kadından izole edilmiştir. Bu virüsünün Japon Ensefaliti (JA) Virüsü, St. Louis Ensefaliti (SLA) Virüsü ve Sarı Humma Virüsü ile ilişkili olduğu sonradan anlaşılmıştır. (1, 3). Batı Nil Virüsü (BNV), Flaviviridae ailesi, Flavivirüs cinsi ve Japon Ensefaliti Virüsü (JEV) serokompleksi içerisinde sınıflandırılan, 45-50 nm büyüklüğünde, zarflı ve ikozahedral yapıya sahip bir RNA virüsüdür. Bu virüs tek iplikli pozitif polariteli RNA genomu içerir. Bu genom kapsid (C), membran (prM/M) ve zarf (E) proteinlerini içeren üçü yapısal ve yedisi yapısal olmayan (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) proteinlerini kodlamaktadır. Olgun viriyon yapısını, yapısal proteinler oluştururken, virüsün transkripsiyonu, replikasyonu ve konağın virüse karşı savunma mekanizmalarının zayıflatılmasını yapısal olmayan proteinler düzenler (10-12).

Batı Nil Virüsü, yeryüzünde diğer flavivirüslere kıyasla daha yaygın görülür (3). BNV'nin yaşam döngüsü başta Culex türleri olmak üzere sivrisinekler ve göçmen kuşlar arasında olduğundan, dünya genelindeki bu yaygınlıktan göçmen kuşlar sorumlu tutulmaktadır (13). Bu virüsün insana bulaşmasında en önemli yol enfekte sivrisineklerin insanı ısırmasıdır. Ancak kan transfüzyonu, organ transplantasyonu, transplasental yol, anne sütü ile bulaşın yanında, laboratuvarlardan kazanılan enfeksiyonlar da bildirilmiştir (12, 14, 15.).

Batı Nil Virüsü (BNV) enfeksiyonları büyük oranda (%80) asemptomatik seyretmekle beraber, daha düşük orandaki (%20) semptomatik hastalarda inkübasyon süresi ortalama 2-14 gündür. Ancak BNV ile doğal yolla oluşan (sivrisinek ısırığı) insan enfeksiyonlarında inkübasyon süresi ortalama 2-6 gündür. İnsanda, enfekte olan kişilerin yaklaşık %20'sinde spondan iyileşen hafif ateşli hastalık (Batı Nil Ateşi) gelişir. BNV kaynaklı santral sinir sistemi (SSS) tutulumu ile ciddi hastalık gelişme oranı ise %1'in altındaki oranlardadır. (11, 12, 14). Bununla beraber BNV, son yıllarda Romanya, Rusya ve İsrail'de ağır nörolojik hasarla seyreden epidemilere de neden olmuştur (16).

Hastalık belirtilerinin görülmesi ve özgül laboratuvar test sonuçlarının klinik ile uyumu sonucu BNV teşhis edilir. BNV'nin virolojik tanısı, kan ve/veya beyin omurilik sıvısının (BOS)'da BNV'ye özgü antikorların veya viral nükleik asidin gösterilmesi ile konur. Ancak serolojik testler BNV'nin tanısında daha baskın rol alır. BNV'nin kandan izolasyonu ise, viremi düzeyinin düşük olması ve vireminin kısa süreli olması sebebiyle çoğunlukla başarısız olur (14, 15, 17, 18).

Günümüzde Afrika, Orta Doğu, Asya, Avustralya, Avrupa ve Amerika'da çok fazla ülkede BNV tespit edilmiştir (19, 20). Türkiye'nin iklim özellikleri, vektör aktiviteleri ile beraber gerek insanda gerek hayvanda BNV olgularının ve BNV salgınlarının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakın ilişkili bir coğrafi konumda yer alması BNV'nin Türkiye'deki varlığını hissettirmektedir. Ülkemizde BNV seropozitifliği ile ilgili veriler 30 yıldan fazladır bilinmekte ve her geçen gün bu veriler pekiştirilmektedir. Son olarak Manisa ve çevresinde, 2010 yılının Ağustos ayında menenjit tablosu ile seyreden BNV ile enfekte hasta olgularının olması ve bu hastalardan üçünün ölmesi, bu virüsün ülkemizdeki önemini ortaya koymaktadır (21).

Türkiye'deki BNV varlığı gösterilmiş olmasına rağmen, BNV'nin bölgelerimizde santral sinir sistemi enfeksiyonlarına neden olup olmadığına dair veriler sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen kan ve Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) örneklerinde BNV'nin serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmasıdır. Bu çalışma bölgemizde BNV'ye bağlı SSS enfeksiyonlarının olup olmadığının belirlenmesi ve kullanılacak yöntemlerin güvenilirliğinin araştırılması, hastalığın güncel durumu hakkında bilgi sağlanması, tıp ve sağlık çevresinde farkındalığın oluşturulması ve Türkiye'de BNV enfeksiyonlarının seroepidemiolojik verilerine katkıda bulunulması açısından önem taşımaktadır.

## **1.1. Genel Bilgiler**

### **1.1.1. Batı Nil Virüsü'nün Tarihçesi**

Virüs, ilk defa 1937 yılında Uganda'nın Batı Nil bölgesinde, ateşi olan erişkin bir kadın hastanın kanından izole edilmiş ve Batı Nil Virüsü olarak literatüre geçmiştir (10). Batı Nil Virüsü'nün Japon ensefaliti virüsü ile yakın ilişkili olduğu 1940'lı yıllarda tespit edilmiş ve yine aynı yıllarda, hem laboratuvar koşullarında hem de saha çalışmaları ile sivrisineklerle bulaşma özelliği desteklenmiş ve aynı zamanda kuşların BNV için çoğaltıcı konak olarak görev yaptığı belirlenmiştir. BNV'nin varlığı 1950 yılının başında Mısır'da da sivrisinek, kuş ve insanlarda gösterilmiştir (11). Aynı yılın sonlarında etkenin insanlarda ve atlarda neden olduğu nörolojik bozukluklar bildirilmiştir (22). İsrail'de 1951-1954 ve 1957 yıllarında epidemi görüldükten sonra yine İsrail'deki 1957 salgınında, BNV'nin yaşlı hastalarda meningoensefalit yaptığı tespit edilmiştir. Fransa'nın Rhone bölgesinde 1962 yılında bildirilen salgın, Avrupa'daki ilk epidemi olmuştur. Bunu Güney Afrika'da 1974 yılında gerçekleşen en büyük epidemi takip etmiştir (12).

Batı Nil Virüsü (BNV); 1990'lı yıllara kadar endemik olduğu Afrika, Asya, Orta Doğu, Avrupa ve Avustralya gibi Eski Dünya ülkelerinde grip benzeri, ateşli, hafif klinik tablolarla karakterize salgınlar oluştururken, 1990 yılının ikinci yarısında daha sık ve ciddi salgınlar yapmaya başlamıştır. Bu salgınlar meningoensefalit tablosu şeklinde Romanya (1996), Fas (1996/2003), İtalya (1998), Rusya (1999) ve İsrail (1998-2000)'den bildirilmiştir (12, 14, 15, 18). İlk defa 1999 yılında New York

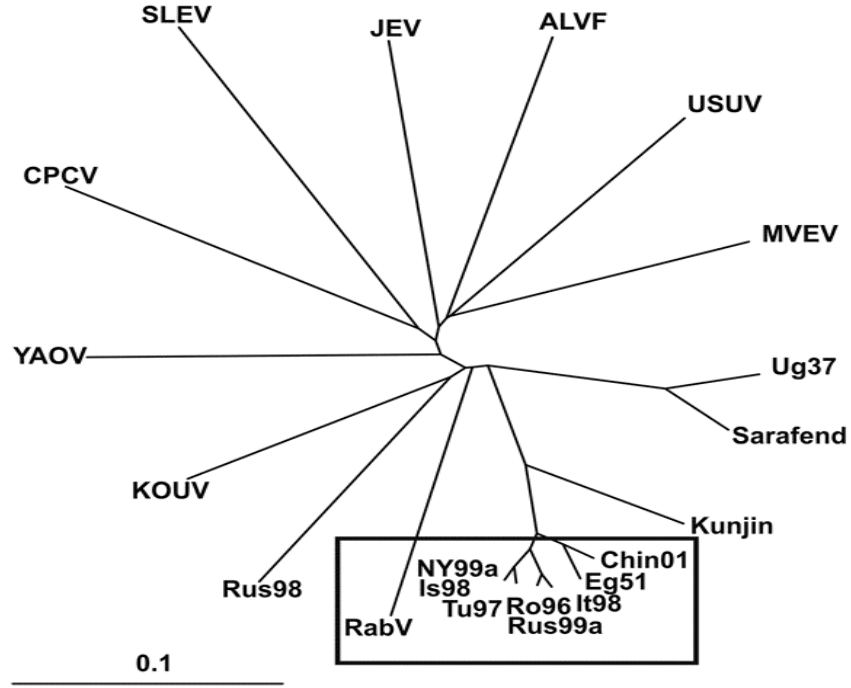
salgını ile Yeni Dünya ülkelerinde tespit edilen BNV, buralarda ensefalit ve ölümlere neden olmuştur (19). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin New York şehrinde 1999 yılının Ağustos ayında gelişen bu salgında, 59 kişide meningoensefalit ve flask paralizi ortaya çıkmış ve bunun üzerine yapılan epidemiyolojik ve çevresel analizler, artropod kaynaklı bir virüs (arbovirüs)'ü göstermiştir (19, 20). Bu salgına etken olarak ilk önce St. Louis ensefaliti virüsü (SLEV) düşünülmüş; ancak aynı zamanda şehir içinde çok sayıda kuşun ölmesi ve SLEV'in kuşları enfekte etme özelliğinin olmaması, dikkatleri bir başka arbovirüs üzerinde yoğunlaştırmaya sebep olmuştur. Bu virüsün 1998 yılında İsrail'de dolaşan Batı Nil Virüsü ile homolog olduğu Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (15, 20).

ABD'nin güney ve ortabatı kısımlarına 2000-2001 yıllarında hızla yayılan Batı Nil virüsü, 2002'nin ikinci yarısında 4156 BNV enfeksiyona sebep olmuştur. Bu enfeksiyonlar ABD tarihinde 284 ölüm ile en büyük arboviral ensefalit salgınına neden olmuştur (12). Bu virüsün Kanada, Kolombiya, Karayipler ve Meksika gibi Güney Amerika ülkelerine yayılması ile Amerika kıtası, BNV için endemik bölge haline gelmiştir. BNV'nin New York'a uluslararası uçak yolculuğu yapan sivrisinekler, viremili kişiler ya da ithal edilen ekzotik kuşlar ile ulaştığı düşünülmüştür (12, 20).

Türkiye'de de insanlarda BNV'ye ilişkin serolojik çalışmalar bulunmakla beraber, ülkemizde arbovirüslere bağlı enfeksiyonlar daha çok hayvanlarda tespit edilmiştir (23). Türkiye, göçmen kuşların geçiş yollarının üzerinde yer alması, hastalığı taşıyan Culex cinsi sivrisinekleri barındırması ve iklim koşullarının virüsün biyolojik siklusuna izin verecek özellikte olması bakımından BNV enfeksiyonu için riskli bir coğrafyadadır. Nitekim ülkemiz insanlarında geçirilmiş enfeksiyonun varlığı az sayıda serolojik çalışmayla gösterilmesine rağmen, ülkemizde akut hastalık teşhisi ilk kez 2010 yılında Manisa bölgesinde konulmuştur. Manisa Devlet Hastanesi'ne 2010 yılının ağustos ayında sinir sistemi bulguları ile başvuran 16 hastadan 3'ünde akut BNV enfeksiyonu tespit edilmiş ve Sakarya, Isparta, İzmir ve Aydın'da yeni vakaların eklenmesi ile kesin tanı konulan hasta sayısı 7'ye ulaşmıştır. Sağlık Bakanlığı'nın resmi rakamlarına göre bu hastalardan üçü hayatını kaybetmiştir (21).

### 1.1.2. Batı Nil Virüsü'nün Sınıflandırılması

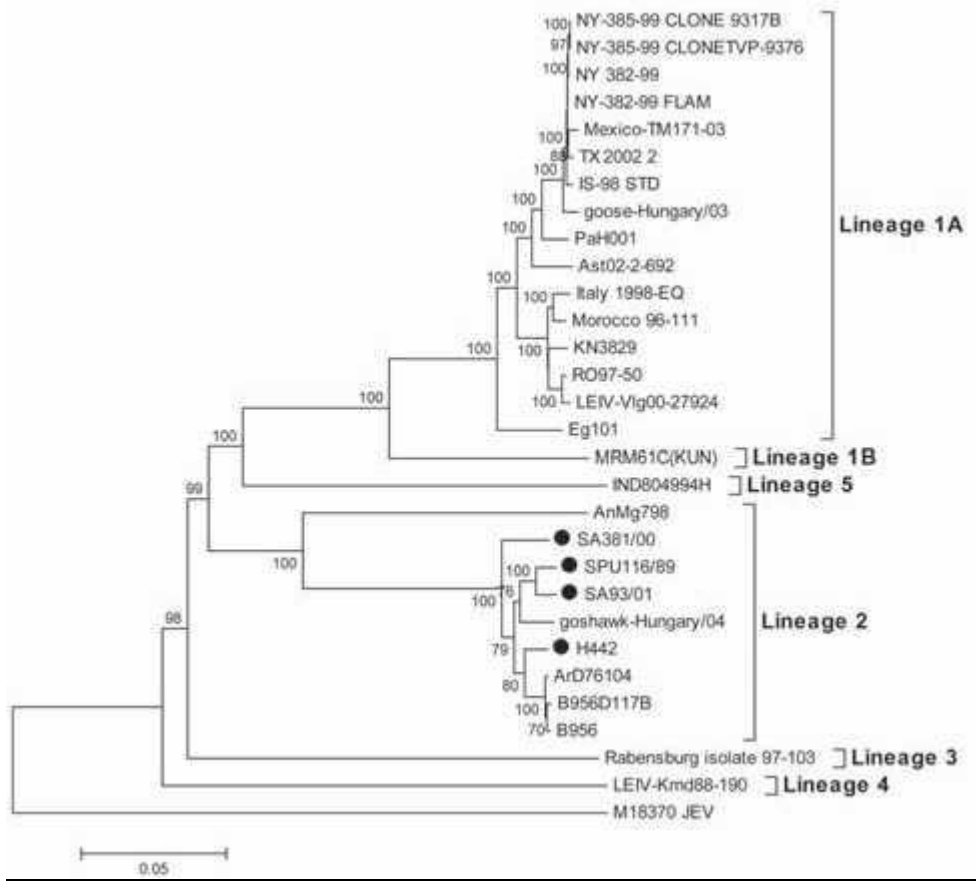
Batı Nil Virüsü, taksonomik olarak Flaviviridae ailesi, Flavivirus cinsi ve Japon Ensefaliti Virüsü (JEV) Serokompleksi içinde yer alan, nörotropik bir arbovirüstür (24). Hepatit C, Sarıhumma ve Denque gibi önemli virüslerle beraber BNV'nin de içinde yer aldığı Flavivirus cinsi yaklaşık 70 virüsten oluşur. BNV ile beraber, JEV, St. Louis ensefaliti virüsü (SLEV), Cacipacore virüs (CPCV), Koutango virüs (KOUV), Murray Valley ensefaliti virüsü (MVEV), Alfuy virüs (ALFV), Usutu virüs (USUV), Yaounde virüs (YAOV) ve Kunjin virüsü; JEV serokompleksini oluşturur (Şekil 1) (25). Kunjin virüs, BNV'nin antijenik ve genetik olarak ilişkili bir alt tipi olarak tanımlanır. Flavivirus cinsindeki virüsler arasında önemli düzeyde antijenik benzerliklerden dolayı serolojik olarak yüksek oranda çapraz reaksiyon görülmektedir (26).



Şekil 1. Japon Ensefaliti Virüsü serokompleksi (25).

### 1.1.3. Batı Nil Virüsü'nün Filogenetik Analizi

Batı Nil Virüsü; nükleik asit dizi analizi, zarf proteinlerindeki aminoasit değişiklikleri ve delesyonlara göre dünyada nükleotid düzeyinde %30 oranında farklılık gösteren beş farklı genetik kökene (lineage) sahiptir (Şekil 2) (25, 27-30 ).



Şekil 2. BNV'nin genetik çeşitliliği (31).

Lineage I; BNV suşları, Kuzey Amerika, Afrika, Orta Doğu, Asya ve Avustralya (Kunjin) izolatlarının antijenik olarak farklı gruplarını içerir (32). Lineage I'e ait BNV suşları insanlarda ciddi nörolojik hastalıklara neden olur (30). Lineage I grup 1a, dünyadaki BNV suşlarının en çok görüldüğü, Avrupa, Afrika, Rusya, Orta Doğu ve Amerika izolatlarının bulunduğu gruptur. Lineage I grup 1b, Avustralya'da tespit edilen Kunjin Virüsü'nün bulunduğu gruptur. Lineage I grup 1c de ise, Hindistan'daki BNV suşları bulunur (33).

Lineage II; Sahra-altı (Güney) Afrika ve Madagaskar'da izole edilen suşlarla, 2004 ve 2005'te Macaristan'da atmacalardan izole edilen ve 1968'de Kıbrıs'ta meydana gelen salgından izole edilen suşları içerir (32, 33). Lineage I grup 1b ile Lineage II suşları genellikle kendini sınırlandıran. Orta şiddette hastalıklara sebep olur (29). Lineage I'e kıyasla Lineage II suşlarının daha az virulan olduğu kabul edililken, son yıllarda Güney Afrikada görülen Lineage II suşlarının ciddi ensefalit olguları bildirilmiştir. Aynı şekilde Lineage I suşlarının genelde ciddi ve nöroinvasiv

hastalıklara sebep olduğu bildirilmekle beraber, son çalışmalar Lineage I ve lineage II'nin her ikisinde de yüksek ve düşük derecede nöroinvaziv hastalık yapan fenotipleri bildirilmiştir. Yine son yıllarda farklı genetik kökenlerin varlığı da bildirilmiştir (32). Lineage I ve lineage II virulan ve attenuue suşlar içermekle beraber patojenite farklılığı, virüsün prM, E veya yapısal olmayan proteinlerindeki spesifik bölgeleri kodlayan nükleotidler ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (24). Suşlarda virulans artışı, BNV NS3 helikazda tek bir aminoasit değişikliği ile ilişkilendirilmiştir (32).

Lineage III, IV ve V ile ilgili bilinenler çok azdır. Ancak Lineage III, Avusturya ve Çek Cumhuriyeti'ndeki *Culex pipiens* sivrisinek izolatlarından (Rabensburg virüs) elde edilen suşları içerir. Lineage IV, Rusya'nın Kafkasya bölgesinde sivrisineklerden, kurbağalardan ve *Dermacentor* türü kenelerden elde edilen suşları; lineage V ise, Hindistan'a ait ayrı bir genotipi içerir (28, 33). BNV suşlarının filogenetik gruplandırması coğrafi dağılım ile ilişkili olmayıp, virüsün yayılımında kuşların potansiyel önemini vurgulamaktadır (21).

Kuzey Amerika'da 1999 ve 2000 yılları arasında izole edilen BNV suşlarının nükleotid dizi analizi, İsrail'de 1998 ve 2000 yıllarında izole edilen BNV suşlarının nükleotid dizi analizi ile neredeyse aynı olduğu (%99.8 homoloji) ortaya çıkmıştır (34). Bu yakın ilişki, Amerika'nın New York şehrine 1999 yılında taşınmış olan virüsün, bir İsrail BNV suşu olduğunu düşündürmüştür (20).

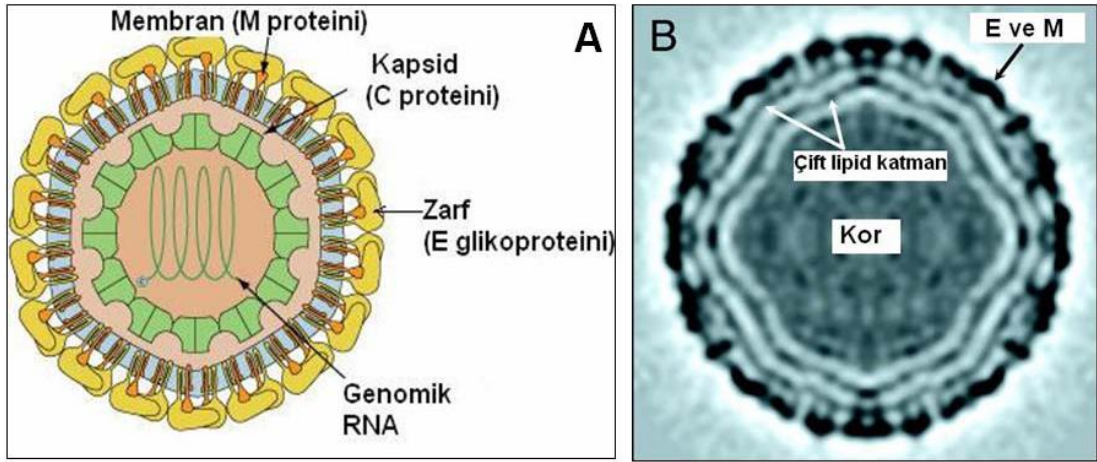
#### **1.1.4. Batı Nil Virüsü'nün Genom Yapısı**

Batı Nil Virüsü; virionları sferik olan, yaklaşık 45-50 nm çapında, zarflı, ikozahedral nükleokapsidli ve 110.000 nükleotidli, tek iplikli, pozitif polariteli bir RNA genomu içerir (26). Viral zarf, M proteini ve E glikoproteini olmak üzere iki integral protein ile konak yelpazesini, doku tropizmi, replikasyon, immün cevap için B ve T hücrelerinin uyarımı gibi virüsün önemli özelliklerini üstlenir. Kriyo-elektron mikroskopik inceleme ile virüsün farklı yoğunluklarda çok tabakalı bir yapıya sahip olduğu izlenir ve zarf üzerinde çıkıntılarının olmadığı dikkati çeker. Dış tabaka E ve M transmembran proteinlerini içerir ve en yüksek yoğunluğa sahip olan tabakadır. Çift katmanlı lipid tabaka, dış tabakanın hemen altındadır. Nükleokapsid kor kısmı ise en içte yer alır (**Şekil 3**) (11, 35).

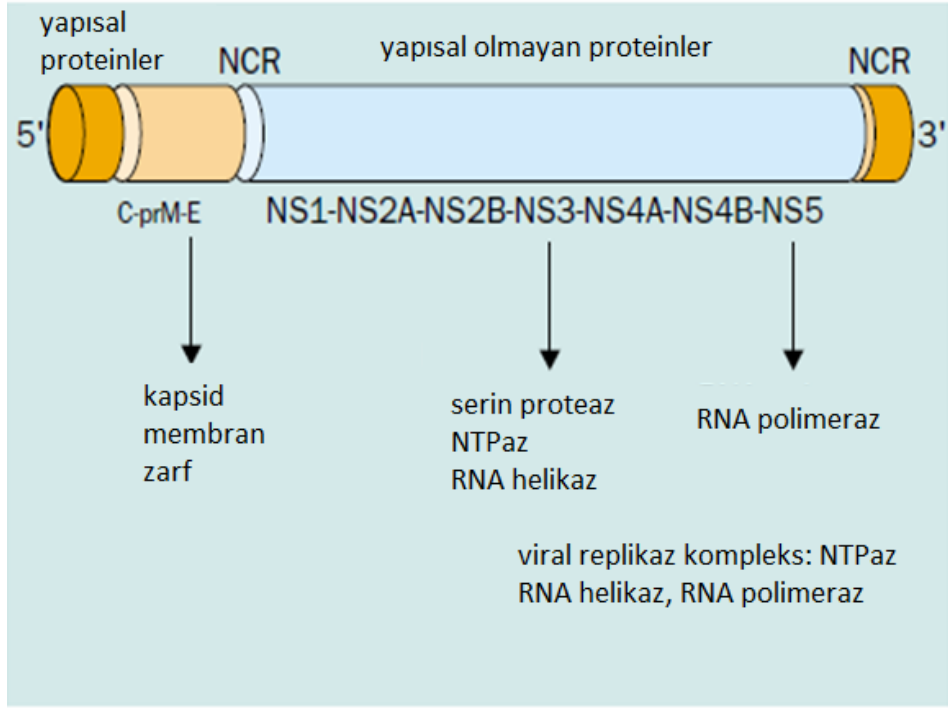
Lineer, tek iplikli, pozitif polariteli, yaklaşık 11 kilobaz (kb) büyüklüğünde RNA'dan oluşan Batı Nil Virüsü'nün genomik RNA'sı, 5' ve 3' uçlarında protein kodlamayan (untranslated region, UTR) kısımlar ile tek bir uzun ORF (açık okuma çerçevesi) kısmını içerir (36, 37). Translasyondan sonra viral ve hücresele proteazlarla parçalanarak fonksiyon kazanan proteinleri oluşturan poliprotein, ORF tarafından kodlanır (21).

### 1.1.5. Batı Nil Virüsü'nün Viral Proteinleri

Batı Nil Virüsü'nün RNA genomu, yaklaşık 100 nükleotidlik kısa bir 5' kodlanmayan (non-coding) bölge ile başlar. Sonra sırasıyla 3 adet yapısal kapsid (C), membran öncülü (prM), zarf (E) ve 7 adet yapısal olmayan (Non-structural, NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B VE NS5) proteinlerini kodlayan tek açık okuma çevresi ile devam eder. En son 600 nükleotidlik kodlanmayan (non-coding) bölge ile son bulur (Şekil 4) (11, 36). Olgun viriyon yapısını, yapısal proteinler oluştururken virüsün transkripsiyonu, replikasyonu ve konağın virüse karşı savunma mekanizmalarının zayıflatılmasını yapısal olmayan proteinler düzenler (12).



Şekil 3. Batı Nil Virüsü'nün şematik yapısı (A) ve elektron mikroskobik görünümü (B) (21).



**Şekil 4.** Batı Nil Virüsü'nün genom yapısı ve proteinleri (11).

Batı Nil Virüsü'nün majör yüzey proteini olan E glikoproteini (53 Kilodalton, kDa), zarf üzerinde, her bir monomeri üç kangaldan oluşan homodimerler şeklinde dizilmiştir. Virüsün hücre yüzeyi reseptörüne tutunması, hücre membranı ile füzyonu ve konağın nötralizan antikor yanıtının indüklenmesi bu kangallar sayesinde olur (35, 37). Antijenik olan kangal, merkezdeki N-glikozilasyon bölgesini taşıyan birinci kangaldır. Endositik vezikül içinde pH'ya bağımlı füzyondan sorumlu olan ikinci yapısal kangaldır. Üçüncü yapısal kangal ise reseptöre bağlanma bölgesi bulundurur (35, 38). E glikoproteini ayrıca virüsün viral hemaglutinin özelliğini üstlenir ve nötralizan antikorların ana hedefidir (39).

Batı Nil Virüsü'nün bir diğer yapısal proteini olan M proteini, öncül protein (precursor M, prM; 18-20 kDa) olarak sentezlenir ve virüs olgunlaşmasının geç döneminde bir konvertaz enzimi (furin) aracılığıyla M proteinine (8 kDa) dönüştürülerek olgun virion yapısına girer (24, 36). PrM proteini de virüsün bir araya gelişi sırasında erken füzyonu önler. E ve M proteinleri, virüse karşı B ve T lenfosit yanıtından sorumludur (39).

Batı Nil Virüsü'nün C proteini (12 kDa), ana kapsid proteini olup viral RNA'ya bağlı bulunur ve nükleokapsidi oluşturur. Nükleokapsid kor yapısı ise, RNA genomunu içerip kapsid proteininin çok sayıda kopyasını barındırır (40).

Batı Nil Virüsü'nün yapısal olmayan (non-structural) proteinlerinin temel görevi viral replikasyonun ve transkripsiyonun düzenlenmesi ile konağın antiviral yanıtının modülasyonudur (41). Bu proteinler arasında en büyük yapıya sahip olan NS5 proteini, bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimidir. RNA "cap" oluşumunda da görev yapan NS5, metiltransferaz aktivitesine de sahiptir (38, 40). Viral serin proteaz aktivitesi gösteren NS3 proteininin N-terminal bölgesi bu aktivite için kofaktör olarak NS2B'ye gereksinim duyar. RNA "capping" olayında da rol oynayan NS3 proteini ayrıca RNA trifosfataz (NTPaz) ile RNA helikaz aktivitelerini de karşılar. NS2A, NS4A ve NS4B gibi diğer yapısal olmayan proteinler, küçük hidrofobik proteinlerdir (**Şekil 4**). Bu proteinlerin viral replikazın hücresel membranlara tutunmasını kolaylaştırdıkları düşünülmektedir. Fakat fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (36, 37). Bununla beraber NS2A'nın, interferon (IFN) yanıtını inhibe ettiği ve viral ünitelerin bir araya toplanması sırasında rol aldığı bildirilmiştir. NS2A'nın, sentezlendikten hemen sonra endoplazmik retikulum (ER)'da bulunan bir konak proteinazı tarafından kesilmesiyle NS1 oluşur. Kesin olarak açıklanamayan bir mekanizma ile hücre membranıyla ilişkili olan NS1, homodimerler oluşturan bir glikoproteindir. Ayrıca NS1, stoplazma dışında da olsa viral replikaz için gerekli bir kofaktördür ve virüs ile enfekte olan hücrenin yüzeyinden eksprese edilir. NS1'in nonnötralizan antikor yanıtına yol da açtığı düşünülmektedir (35, 42). Son olarak NS4A ve NS4B proteinleri virüsün, konak hücresinin antiviral etkisinden kaçışında konak hücresinin IFN- $\alpha/\beta$  sinyal yolağını değiştirerek rol oynar (**Şekil 4**) (43).

#### **1.1.6. Batı Nil Virüsü'nün Replikasyonu**

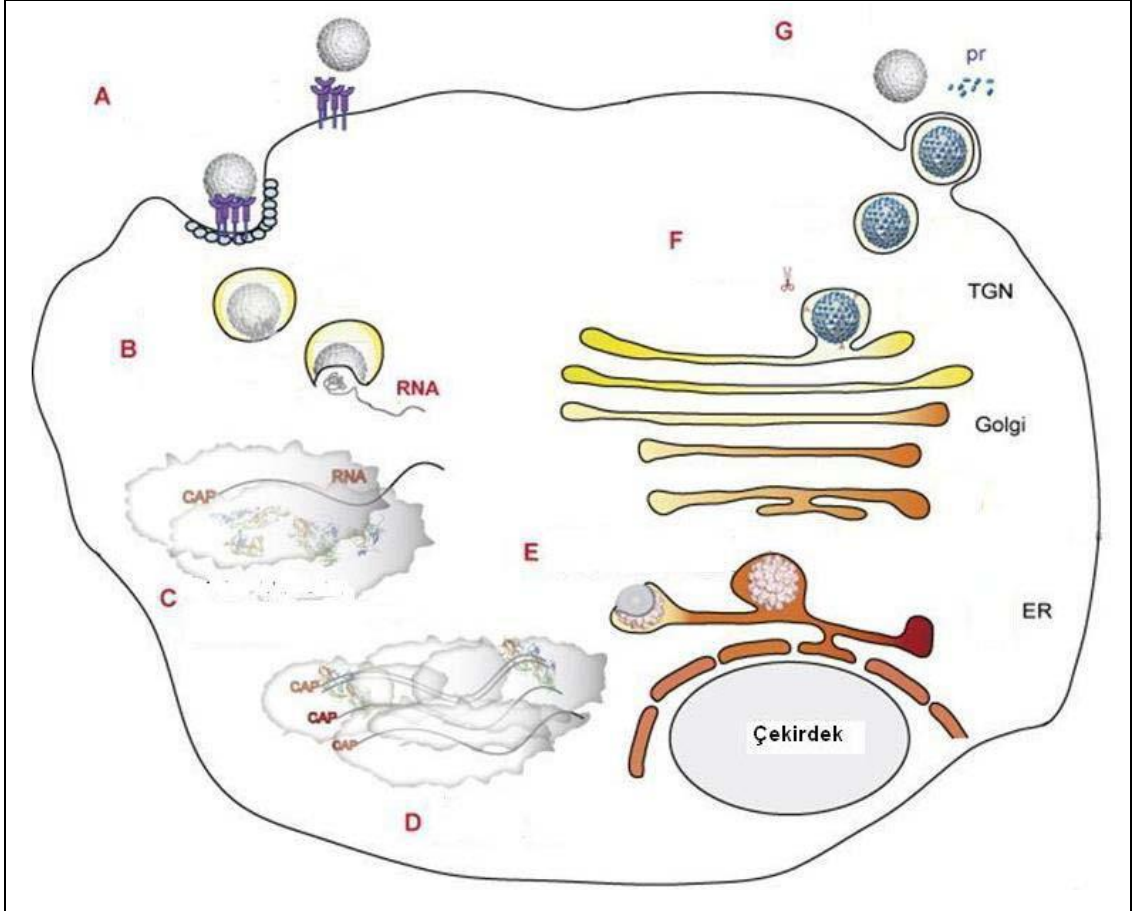
Batı Nil Virüsü'nün replikasyonunda birinci basamak hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanmaktır. Son zamanlardaki in vitro çalışmalar, BNV'nin hücreye tutunmasında dendritik hücre adhezyon moleküllerinden Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), DC-SIGN-R ve integrin  $\alpha\beta 3$  gibi yüzey lektinlerini reseptör olarak kullandığı

bildirilmiştir (44, 45). Ancak, nöronlar gibi patogeneizde önem taşıyan hücelere girişte kullanılan reseptörler tam olarak tanımlanamamıştır (43). BNV hücre yüzeyindeki reseptörüne tutunduktan sonra reseptör aracılı, pH bağımlı endositoz yoluyla hücre içine alınır (26). pH kaynaklı E proteinindeki konformasyonel değişiklik sonucu endozomal vezikül membranı ile viral zarf kaynaşır ve nükleokapsid stoplazmaya geçer (**Şekil 5**). Pozitif polariteli tek iplikli genomik RNA, mRNA gibi çalışarak büyük tek molekül halinde bir poliprotein öncülü sentezler. Bu poliproteine, viral serin proteaz (NS2B-NS3) ile farklı hücre proteazları birden fazla bölgeden tutunarak viral proteinleri keser ve bu proteinleri fonksiyonel hale getirir. Diğer yapısal olmayan viral proteinlerin ve hücre proteinlerinin de yardım etmesi ile viral RNA polimeraz (NS5) enzimi, komplementer negatif iplikli RNA'yı pozitif polariteli tek iplikli genomik RNA kalıbından kopyalar. Kopyalanan bu RNA'lar, negatif polariteli olup yeni genomik RNA'ların transkripsiyonu için kalıp görevi görür (36).

Batı Nil Virüsü'nün progeni RNA'ları ve yeni sentezlenen kapsid proteinleri endoplazmik retikulum membranında bir araya gelir. Viriyon olgunlaşması ise hücrenin salgısal yolağında gerçekleşir (43). Endoplazmik retikulum lümeninden tomurcuklanan nükleokapsid prM ve E heterodimerlerini alarak olgunlaşmamış patrikülleri oluşturur. Veziküllerde biriken olgunlaşmamış bu patriküller daha sonra E ve prM proteinleri üzerindeki glikanların farklılaştığı konak salgısal yolağına taşınırlar (43). Hücresel furin veya furin-benzeri proteazlar ile prM proteini, düşük pH'nın da katkısıyla trans-Golgi ağından geçiş esnasında kesilir ve pr peptidi molekülden ayrılır. Serbest kalan pr proteini, viral patrikülün yeniden düzenlenmesini, olgunlaşmasını sağlar. Vezikül içerisinde plazma membranına aktarılan bu olgunlaşmış viriyonlar, ekzositoz ile hücre dışına atılır (**Şekil 5**) (35, 38). Viriyon ekzositozunda aktin filamentinin rol aldığı bildirilmiştir (46).

Diğer flavivirüslerin 16-24 saat olan latent dönemi ile karşılaştırıldığında BNV'nin hücre içindeki latent dönemi oldukça kısa olup 4-6 saattir. Progeni viriyonların 12 saat sonra enfekte hücrelerin sitoplazmik membranından yoğun olarak tomurcuklandığı gösterilmiştir (44). BNV enfeksiyonu sırasında, enfeksiyöz olmayan virüs benzeri partiküller (Virüs-Like Particles) de hücre içinde olgun viriyonlarla beraber olduğu ve hücre dışına salındığı tespit edilmiştir (47). Yapısal

ve fizyokimyasal özellikleri bakımından olgun virüs partikülüne oldukça benzeyen E, M ve bazen de prM proteinlerini içeren partiküller hücre membranından oluşur ve konakta antijenik etki yaparlar. Bu yüzden bu partiküller rekombinant aşı çalışmalarında ve serolojik testlerde antijen olarak kullanılırlar (47, 48).



**A.** Viriyon hücre yüzeyi reseptörüne tutunması ve endositozu; **B.** Viral glikoproteinler ile endozomal membran füzyonu, genomik RNA'nın stoplazmaya geçişi; **C.** Viral RNA'nın translasyonu ve poliproteininin proteazlarla kesimi; **D.** Progeni RNA'ların transkripsiyonu; **E.** Endoplazmik retikulum (ER) membranında progeni RNA ile kapsid proteinlerinin paketlenmesi, endoplazmik retikulum lümeninden E-prM heterodimerlerini içeren zarfi alarak tomurcuklanması; **F.** Olgunlaşmamış viral partiküllerin salgısal yolağa geçişi, transgolgi ağında (tgn) prM proteininin kesimi ve virionların olgunlaşması; **G.** Olgun viriyon ekzositozu şeklindedir (21).

**Şekil 5.** Batı Nil Virüsü'nün replikasyon döngüsü (21).

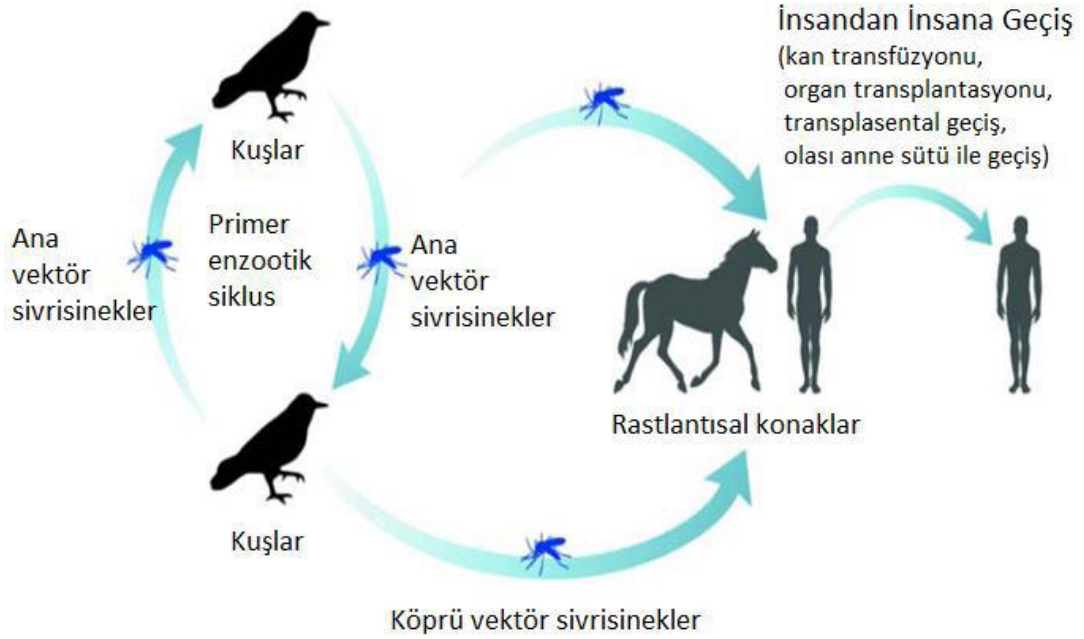
Batı Nil Virüsü, başta tavuk, ördek ve fare embriyo hücreleri olmak üzere, maymun, insan, domuz ve kobaylardan yapılan devamlı hücre kültürleri gibi in vitro ortamlarda üretilir. Bu kültür ortamlarında virüsün sitopatik etkisi hücrelerde küçülme, yuvarlaklaşma ve bazen sinsitya oluşumu şeklinde görülebilir (49).

### **1.1.7. Batı Nil Virüsü'nün Doğadaki Yaşam Döngüsü**

Batı Nil Virüsü'nün doğadaki yaşam döngüsü, sivrisinek-kuş-sivrisinek şeklinde gerçekleşir (15). Sivrisinekler, BNV ile enfekte kuşlardan kan emerek virüsü alır ve yaklaşık 10 gün ile 2 hafta arasında değişen bir inkübasyon döneminden sonra, virüsü başka bir kuşa veya insan gibi bir omurgalıya aktarır (**Şekil 6**) (50). Ayrıca kuşlar arasında oral ve fekal-oral bulaşlar olduğu da gösterilmiştir (51). Bu döngüde asıl etmen olarak *Culex* cinsi sivrisinekler rol alır ve sadece ABD'de toplam 43 adet *Culex* cinsinden BNV izole edilmiştir (11, 52). Keza, Avrupa'da *C.pipiens*, *C.modestus* ve *Coquillettidia richiardii*; Afrika ve Orta Doğu'da *C.univittatus*, Asya'da ise *C.quinquefasciatus*, *C.tritaeniorhynchus* ve *C.vishnui* türleri BNV döngüsünde rol alır (12, 53). Aynı şekilde Amerika'da yapılan çalışmalarda 146 adet kuş türünden de BNV izole edilmiştir (14). Ancak farklı türler de virüsün insanlara bulaşmasında köprü vektör (bridging vectors) rolünü üstlenebilir (14).

Batı Nil Virüsü'nün primer konağı (rezervuar) yabani kuşlar, primer vektörü ise sivrisinek (Culicidae)'lerdir. Vireminin yüksek (10<sup>9</sup> pfu/ml, Plak oluşturan ünite/mililitre) ve uzun (7-8 gün) süreli olduğu Passeriforme (ötücü kuşlar) takımında yer alan kuşların (karga, karatavuk, ispinoz, çalı bülbülü, serçe), BNV'nin doğada kalmasında daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir. Oysaki vireminin düşük ( $\leq 10^3$  pfu/ml) ve kısa süreli (ortalama 3 gün) olduğu insanlar ve atlar virüsü sivrisineklere aktarmada fazla etkili olmamıştır ve bu yüzden son konak (dead-end host) olarak kabul edilmiştir (12, 14, 15).

## Batı Nil Virüsü Bulaşma Döngüsü



Şekil 6. Batı Nil Virüsü'nün bulaş döngüsü (20).

Ilıman iklimli çörfyaların kuytu yerlerinde kışı geçiren sivrisinekler, sıcaklığın artmasıyla virüsü bulaştırmaya devam ederler. Virüsün seyri, duyarlı kuşların ölümü ve akabinde genel kuş popülasyonunda bağışıklık gelişmesi şeklindedir. İnsanlara bulaşın derecesi de, viremili sivrisineklerin bolluğuna, beslenme şekline ve yerel ekolojisine bağlıdır (53).

Batı Nil Virüsü'nün yaşam döngüsünde yumuşak (*Argasidae*, *Argas spp.*) ve sert (*Ixodidae*, *Hyalomma spp.*) kenelerin vektöriyel rollerinin olmadığı bildirilmiştir (53). Ancak BNV'nin Moldavia'da, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus*'dan, Macaristan'da da *I. ricinus*'dan izole edilmesi kenelerin de virüs tarafından enfekte edildiği göstermiştir (54). Tatarcıkların potansiyel vektör olabileceklerine dair veri yoktur (21).

İnsan ve atlardan başka; yarası, tavşan, fare, sincap, kedi, köpek, sığır, keçi ve deve gibi hayvanlar BNV'ye duyarlı bulunmuştur. Kedi ve köpek gibi domestik hayvanlar BNV ile enfekte olsa da bu hayvanlarda klinik bir hastalığın ortaya çıkmadığı ve hayvanlardan insana virüsün bulaşmadığı belirtilmiştir (15). Ayrıca BNV'nin, sürüngen (timsah) ve amfibi (kurbağa)'lerde uzun süreli viremi yapıp kışı bu barındırıcı konaklarda geçirdiği raporlanmıştır (50, 53).

Batı Nil Virüsü'nün farklı coğrafyalar arasında nakli, viremik göçmen kuşlarla olur. Bu yüzden bahar göçleri sırasında göçmen kuşlar virüsün Avrasya'nın sıcak bölgelerine yayılmasında önemli rol oynarlar (55). Batı Nil Virüsü ile enfekte kuşlarda genellikle herhangi bir semptom görülmez. 1997'ye kadar BNV'nin kuşlar için patojen olmadığı düşünülmüş ancak 1997-1998'de daha virulan bir BNV suşu İsrail'de, leylek ve diğer göçmen kuşların ölümüne sebep olmuştur (56, 57). Buna rağmen, kuş ölümlerinin BNV ile ilgisi, 1999'da Avrupa'da gerçekleşen salgınlara ve virüsün New York'ta aniden ortaya çıkışına kadar anlaşılammıştır. New York salgınında karga türleri başta olmak üzere binlerce kuş telef olmuş, ölümlerle sonuçlanan insan ve at vakaları bildirilmiştir (53).

Batı Nil Virüsü hayvanlardan en çok atları (Equidae) enfekte eder (58, 59). Sivrisinek ısırması ile atlara bulaşan virüs, insanlar gibi atlarda da çoğunlukla klinik bir hastalık oluşturmaz. Ancak bazen halsizlik, tremor, kısmi paralizi ve ekstremitelerde zayıflığı görülebilir (58, 59). 2003 yılında atlarda BNV enfeksiyonu sayısının 14.000'den fazla olduğu ve mortalite oranının yaklaşık %35-40 olduğu ifade edilmiştir (15).

### **1.1.8. Batı Nil Virüsü'nün Patogenezi**

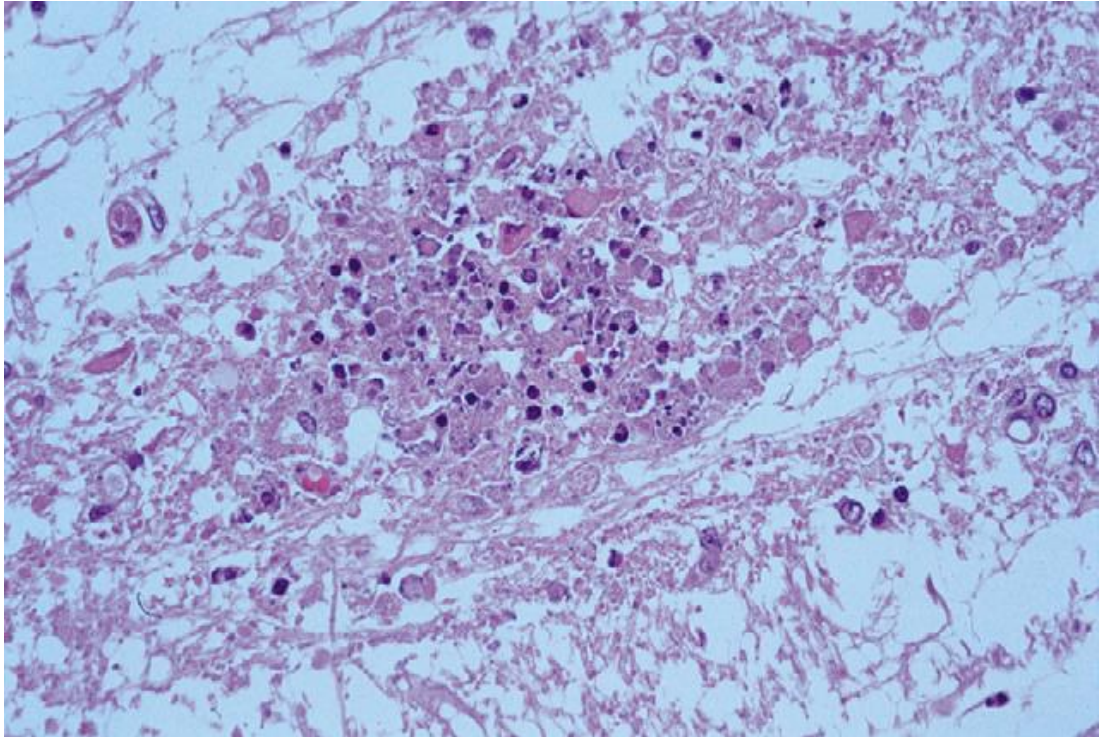
Batı Nil Virüsü'nün replikasyon ve yayılmasında vektör-konakçı ilişkisi önemli rol alır. Bununla beraber çoğu vektörde patolojik değişiklik görülmez. BNV, beslenmek için enfekte konakçıdan kanı emen sivrisineklere bulaşır ve virüs kan yolu ile ilk olarak sivrisineklerin mesenteriyal epitel hücrelerini enfekte eder ve burada çoğalmaya başlar. Virüs sonra tükrük bezlerine ulaşır ve burada da çoğalmaya devam eder (60). Virüsü tükrük bezlerinde taşıyan sivrisinekler, başka bir kan emme işlemi esnasında insan veya hayvan gibi duyarlı konağa virüsü subkutan olarak inoküle eder. Virüs deride keratinosit, Langerhans (dendritik) hücreleri enfekte eder. Periferik inokülasyon ile virüsün duyarlı konaklardaki ilk replikasyonu deride bulunup lenf nodlarına drene olan Langerhans (dendritik) hücrelerinde gerçekleşir (61). Virüsün lenf nodlarına göçü esnasında dendritik hücreler (DH) de tip-I ve tip-II interferon (IFN) salgılayarak virüsün kontagiyöz yayılmasını sınırlandırır. Lenf bezlerindeki makrofajlar, B lenfositleri ve foliküler DH'de çoğalan virüs, buradan afferent lenf kanallarıyla torasik lenf kanalına, oradan da dolaşıma geçer ve primer viremi

oluşturur. Bu viremi ile virüs; karaciğer, böbrek, dalak gibi retiküloendotelyal sistem organlarına, epitelyum hücreleri ve makrofajlara hematojen yolla yayılır ve sekonder viremi yapar. Virüs bu dokularda çoğalarak viremiyi devam ettirir (**Şekil 8**) (61, 62). Bu viremi, klinik semptonlardan 2 gün önce başlar ve semptonların 4 gün sonrasına kadar devam eder. Ancak immün yanıtın virüsü temizlemesi nedeniyle virüsün kandan izolasyonu ihtimali, semptomların başladığı ilk günden başlayarak ciddi düzeyde düşmeye başlar (11).

Batı Nil Virüsü'nün SSS'ye yayılması, vireminin en yüksek olduğu virüsün periferik dokulardan temizlenmesinden hemen önceki dönemde gerçekleşir (61). BNV'nin BOS'a geçişinde çeşirli mekanizmaların rol aldığı öne sürülmüştür: (I) Endotelyal veya koroid pleksus enfeksiyonu ya da virüs pasif difüzyon ile kapiller endotel hücrelerine geçer, virüsün replikasyonu bu hücrelerde olur ve virüs tomurcuklanarak SSS parankimine geçer. (II) Olfaktör nöron enfeksiyonu ve olfaktör loba yayılım. (III) 'Trojan horse' mekanizması ile virüsün enfekte immün hücrelerle BOS'a geçişi. (IV) Aksonal retrograd yol ile enfekte periferik nöronlardan BOS'a geçiş (62, 63). Yapılan çalışmalarla virüsün kan-beyin engelini aşmada toll-like resptörlerin uyarılması ve kan beyin bariyeri permeabilitesini artıran tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), makrofaj inhibe edici faktör (MIF) gibi bazı çözümlü inflamatuvar faktörlerin rol aldığı gösterilmiştir (64-66). TNF- $\alpha$ , kan-beyin engeli geçirgenliğini değiştirerek virüsün SSS'ye geçişini kolaylaştırır (43).

Kan-Beyin bariyerini aşır SSS'ye ulaşan virüs, serebral korteks, hipokampus, bazal ganglionlar, serebellum, beyin kökü ve omuriliği enfekte eder (43). Beyin ve omurilikte BNV'nin birinci hedefi nöronlar olduğundan, ilk patolojik hasar nöronlarda dejenerasyon, yapı ve fonksiyon kaybı ile apoptozdur (64). Nöronların sağkalımını artıran IFN- $\alpha/\beta$ , SSS'de enfeksiyonun kontrolünde rol alır. Cluster of Differentiation 4 (CD4) ve Cluster of Differentiation 8 (CD8) T lenfositleri ile monositlerin SSS'ye girişini kolaylaştıran C-X-C motifi kemokin 10 (CXCL10) ve Kemokin (C-C motifi) ligandı 5 (CCL5) gibi kemokinlerle onların ligantları olan Kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3 (CXCR3), Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5 (CCR5) ise, enfekte dokulardan virüsün temizlenmesini kolaylaştırır (43).

Batı Nil Virüsü'nün SSS'de yaptığı patolojik değişiklikler; (I) virüsün nöron ve glia hücrelerindeki proliferasyonuna, (II) enfekte hücelere karşı oluşan sitotoksik hücre yanıtına, (III) yaygın perivasküler inflamasyona ve (IV) mikroglial nodül oluşumuna bağlıdır (11). Virüs SSS'de, hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve erime, dokularda iflamasyona sebep olur. Fatal BNV enfeksiyonlarının SSS'de yaygın inflamasyon, yaygın nöronal dejenerasyon spinal kordda küçük hemorajiler görülür. Virüsün sebep olduğu meningoensefalitten ölen dört hastada yapılan postmortem incelemeler ile SSS'de perivasküler ve leptomeningial kronik inflamasyon, mikroglial nodüller, başta temporal loplara ve beynin alt kısımlarında nöronofaji tespit edilmiştir (Şekil 7). Bu özellikleri ile virüsün SSS patolojisi polio paralizisine benzer (60). Bol miktarda lenfosit (CD8+T baskın) ve histiyosit içeren nodüller, çoğunlukla nöronal dejenerasyonun yoğun olduğu bölgelerde görülür. B lenfositler perivasküler inflamasyon bölgelerinde sık görülür. Meningoensefalit olgularında, antikor yanıtı başlayınca klinik semptomlar görülür (64). Enfeksiyonun 8.gününde serum ve BOS'da IgM pozitifliği olguların %70-80'inde, görülür. Viral replikasyonunun azaltılmasında BOS antikorları önem arzeder (67).



**Şekil 7.** Fatal BNV enfeksiyonunda beyin dokusunda nötrofil ve mikroglial infiltrasyonla beraber nöronal nekroz (11).

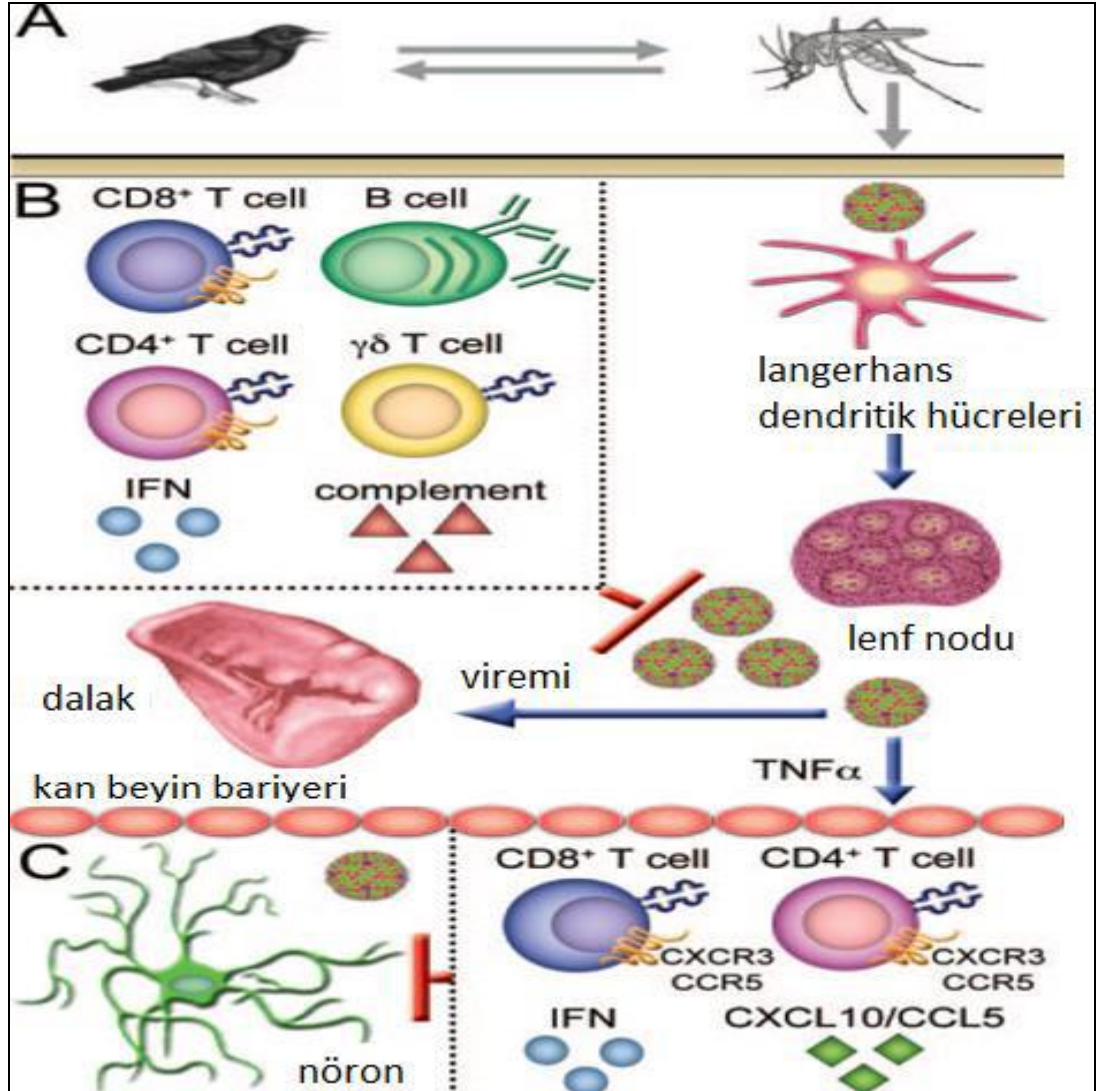
Son zamanlarda, BNV enfeksiyonlarının patogeneğinde konağa ait bazı faktörlerin de rol aldığı saptanmıştır. Bunlardan biri CCR5 kemokindir, enfekte nöronların temizlenmesi için lökositlerin beyne göçünü sağlar. Diğeri ise 2'5'-oligoadenilat sentetaz (OAS)'tır, IRG (IFN-regulated gene) ailesi üyesi olup, viral RNA'yı parçalar. CCR5 ve OAS gen delesyonları ve/veya mutasyonları varlığında, semptomatik BNV enfeksiyonlarına karşı yatkınlığın arttığı saptanmıştır (68).

### 1.1.9. Batı Nil Virüsü'ne Karşı Gelişen İmmün Yanıt

Batı Nil Virüsü RNA'sı, endozom membranındaki Toll-benzeri reseptörler (TLR-3 ve TLR-7), stoplazmadaki helikazlar [RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) ve MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5)] ile lenf bezlerinde bulunan DH ve makrofajlar tarafından algılanır (67). Bu algılama ile virüse karşı interferona bağımlı ve interferondan bağımsız mekanizmalarla doğal immün yanıt oluşur. En önemli doğal bağımsız bileşeni; IRF-3 (interferon regulatory factor-3) yolağının aktivasyonu sonucu oluşan tip-I IFN ( $\alpha/\beta$ )'dir (69-71). IFN- $\alpha/\beta$  sinyal yolağında bir bozukluk olduğunda viral replikasyonun arttığı ve virüsün doku tropizminin genişlediği çalışmalarda gösterilmiştir (64, 72). Aynı şekilde virüsün SSS'ye yayılmasını önleyen tip-II IFN ( $\gamma$ ),  $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından üretilir ve virüsün periferik replikasyonu sınırlandırır (**Şekil 8**) (64, 73). Ayrıca, virüse karşı doğal bağımsızlıkta TLR-3 ve 2'5'-oligoadenilat sentetaz (OAS) yolaklarının da düzenleyici role sahip olduğu çalışmalarda saptanmıştır (64, 65).

Batı Nil Virüsü'ne karşı oluşan kazanılmış immün yanıt virüsünün eradikasyonunu sağlar. Ciddi anlamda nötralizan antikor yanıtı virüsün E proteinine karşı gelişirken, NS1 ve prM, M proteinlerine karşı oluşan antikorların da BNV enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığı bildirilmiştir (64). Vireminin sınırlandırılması, virüsün SSS'ye girişinin önlenmesi ve hastalığın gidişatının düzenlenmesinde önemli rol alan özgül IgM tipi nötralizan antikorların subkütanöz enfeksiyondan dört gün sonra ortaya çıktığı fare deneylerinde saptanmıştır (74). Bu yüzden immün yetmezlik gibi antikor yanıtının düşük ya da eksik olduğu durumlarda BNV'nin daha ciddi enfeksiyonlar yapması, letal BNV enfeksiyonu riskinin kompleman komponentlerinden C3 ve C4 eksikliği ya da kompleman reseptörü 1 ve 2'nin eksikliğinde artması BNV'ye karşı gelişen humoral immün yanıtın önemini ortaya

koymaktadır (75). Yapılan çalışmalarda, CD4+T (Th) hücre eksikliğinde, B hücre uyarımı ve nötralizan antikor yanıtının azalması; sitotoksik T lenfosit hücre eksikliğinde de viral yük ile SSS tutulumunun artması ve mortalitenin yükselmesi, BNV'ye karşı hücrel immün yanıtın önemini ortaya koymaktadır (76, 77). Benzer şekilde SSS'de, virüs ile enfekte nöronları sitotoksik T lenfositleri, perforin ve Fas ligand yoluyla öldürürken; Th hücreleri de bu yanıtın düzenlenmesinde rol aynar. Özetle, BNV'nin periferal dokulardan temizlenmesinde humoral immün yanıt; SSS'den temizlenmesinde de hücrel immün yanıt (T hücreleri) görev alır (Şekil 8) (76).



Şekil 8. Batı Nil Virüsüne karşı gelişen immün yanıt (43)

Batı Nil Virüsü, doğal immün yanıtta çeşitli mekanizmalarla kaçabilir (78).

1. Virüs viral RNA'yı tanıyan RIG-I ve MDA5 gibi hücrel tanıma reseptörlerinden (PRR, Pattern Recognition Receptor) RNA'sını saklayarak ya da maskeleyerek kaçır ve tip-I IFN indüksiyonunu geciktirerek replikasyonu için zaman kazandırır.

2. Viral NS2A proteininin, IFN- $\beta$  gen transkripsiyonunu; NS1 proteininin ise, TLR-3 sinyal yolağını inhibe etmesi gibi; virüsün yapısal olmayan proteinleri IFN sinyal yolağını inhibe eder ya da değiştirir (68, 72, 78).

3. Patojenik "lineage I" suşlarının, NS4B proteinleri JAK/STAT sinyal yolunu değiştirir ve tip-I IFN yanıtını bozar. Bu özellik Lineage I suşlarına has olup tam olarak aydınlatılmamıştır (72, 79-81).

### **1.1.10. Batı Nil Virüsü'nün Bulaşma Yolları**

#### **1.1.10.1. Sivrisinek Isırığı**

Batı Nil Virüsü'nün insana bulaşmasında temel yol enfekte *Culex* cinsi sivrisineklerin insanı ısırmasıdır. Bulaşta en önemli tür ise, *C. pipiens* türü olup çoğu bölgede virüsün enzootik döngüsünde yer alır (14, 20). Erişkin sivrisinekler, ılıman iklime sahip coğrafyalarda ilkbahar aylarının sonuna doğru ortaya çıkar ve sonbaharın ilk aylarına kadar dolaşımında kalırlar. Ancak tropikal bölgelerde ise bulaştırıcılık yıl boyu devam eder (15, 24).

#### **1.1.10.2. Kan Transfüzyonu**

Batı Nil Virüsü kan kaynaklarının güvenilirliğini tehdit edecek derecede, transfüzyonla bulaşan önemli patojenlerden biri haline gelmiştir (82). BNV'nin transfüzyonla bulaşma riskinin HIV ve HCV bulaşma riskinden 2000 kat, HBV bulaşma riskinden 200 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (83). 2002 yılında ABD'de meydana gelen BNV salgınında, viremik 16 kan donöründen trombosit süspansiyonu, eritrosit süspansiyonu veya plazma alan 23 kişide transfüzyon sonrası bulaş olduğu tespit edilmiştir. Transfüzyondan sonra 15 alıcıda, 2-21 gün içerisinde BNV kaynaklı hastalık gözlenmiştir. Bu donörlerin hiç birisinde kan bağıışı esnasında BNV IgM pozitifliği tespit edilememiştir. Bu yüzden düşük düzeyli ve kısa süreli vireminin görüldüğü BNV kaynaklı asemptomatik enfeksiyonlarda BNV seropozitifliğinin araştırılması bulaşı önlemede yetersiz kalmakta, BNV kan ve kan ürünleriyle farkında olmadan bulaşabilmektedir (84). Bu veriler ışığında, 2003

yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration, FDA) tarafından bulaş riskinin yüksek olduğu mevsimlerde tüm kan bankalarında kan bağışından sonraki 28 gün içinde ateş ve baş ağrısı olanlar ve bunların donörleri taranmıştır. Ancak hastaların %20'sinde semptomlar ortaya çıktığı için bu çalışmalar etkisiz kalmış, daha sonra tarama için nükleik asit testleri (NAT)'nin kullanılmasının gerekliliği belirtilmiştir (21). FDA tarafından böyle bir onayı alan NAT, ABD'de 2003 yılı Haziran sonu ile Eylül ortalarında tüm sivil kan bağışlarında BNV taranması için kullanılmıştır. 2.5 milyon donörün 489'unda NAT reaktif saptanmıştır. Bu viremik donörlerin yaklaşık %90'ı asemptomatik olup sadece iki kişide BNV kaynaklı meningoensefalit gelişmiştir. Bu sonuçla BNV ile enfekte kan ürünlerinin gözden kaçırılmasının sebebinin düşük viremi seviyesine mi yoksa kullanılan diğer testlerin yetersizliğine mi bağlı olduğu tespit edilememiştir (85, 86).

#### **1.1.10.3. Organ Nakli**

Batı Nil Virüsü'nün organ transplantasyonu ile bulaşı ilk defa 2002 yılı ağustos ayında BNV ile enfekte bir vericinin organlarının 4 alıcıya nakledilmesi sonucu rapor edilmiştir (87, 88).

Bu dört alıcının hepsinde ateş saptanmış, 3'ünde meningoensefalit gelişmiştir. Dört alıcıdan da BNV izole edilmiştir. Organ donörünün serum ve plazma örneklerinde Polimerase Chain Reaction (PCR) yöntemi ile BNV tespit edilmiştir. Bu organ donörü de daha önce 63 vericiden kan almış ve buna kan verenlerin bağış sırasında viremik olduğu daha sonra bildirilmiştir (88).

#### **1.1.10.4. Anne Sütü**

Batı Nil Virüsü'nün anne sütü ile bulaşı ilk defa 2002 yılında bildirilmiştir. Postpartum kanama nedeniyle Ekim 2002'de bir kadına kan transfüzyonu yapılmış ve bu kadında doğumdan 11 gün sonra meningoensefalit gelişmiştir. Bu kadının BOS'unda BNV spesifik IgM pozitif bulunmuştur. Bu BNV ile enfekte kadın hasta bebeğini emzirmeye devam etmiş ve doğumdan 16 gün sonra alınan süt örneğinde PCR ile BNV tespit edilmiş. Süt aynı zamanda BNV IgG ve IgM açısından da pozitif bulunmuştur. Bebekten 25 gün sonra alınan serumda BNV IgM pozitif bulunduğu halde, bebek afibril ve sağlıklı kalmıştır. Anne sütünün enfeksiyon kaynağı olduğu, bebeğin çok az dış ortamda kalması ve diğer sivrisinek kaynaklarından uzak

olmasına bağlanmıştır. Buna rağmen anne sütünün faydalarından dolayı BNV ile enfekte anneler bebeğine sütünü vermeye devam edilmesi görüşüne varılmıştır (89).

#### **1.1.10.5. Transplental Geçiş**

Batı Nil Virüsü'nün transplental geçiş ile ilgili, Ağustos 2002'de acil servise başvuran 20 yaşında gebe bir kadının BOS ve serum örneklerinde BNV IgM pozitifliği saptanmıştır. Hasta kadın 5 hafta sonra doğum yapmış, yenidoğanda serolojik testlerle BNV izole edilmiştir. Yenidoğan bebekte bilateral koryoretinit ve MR (Manyetik Rezonans görüntüleme)'da temporal ve oksipital loblarda beyaz cevher kaybı gözlenmiştir. Bu nedenle gebe kadınlar BNV açısından önlem alınarak izlenmeli, gerektiğinde hemen taramaya alınmalıdır. BNV için özel bir tedavi seçeneği bulunmadığından asemptomatik gebelerde veya yenidoğanlarda tarama testleri tavsiye edilmemektedir. BNV antikoru yaklaşık 1 yıl pozitif kaldığından enfeksiyonun ne zaman geliştiği tam olarak kestirilememektedir (90).

#### **1.1.10.6. Laboratuvardan Bulaş**

Batı Nil Virüsü sürveyansı için 2002 yılında hayvan otopsisini yaparken iki laboratuvar personeli perkütanöz olarak yaralanmıştır ve her iki hastada da başka bir risk faktörü saptanmamıştır. İkisinde de hafif seyirli tamamen iyileşen enfeksiyon gelişmiştir (15, 90).

#### **1.1.11. Risk Grubu**

Batı Nil Virüsü enfeksiyonlarından nöroinvaziv hastalığın gelişiminde en önemli risk faktörü ileri yaş olarak tanımlanmıştır (15, 24). BNV'ye bağlı SSS tutulumunun 50 yaş üzerindeki kişilerde riskinin yüksek olması, bu kişilerde kan-beyin engelini bozan hipertansiyon gibi faktörlerin varlığına veya immün sistem fonksiyonlarının azalması nedeniyle viremi süresinin uzamasına bağlanmaktadır (15). Ayrıca BNV enfeksiyonları küçük çocuklar, immün sistemi baskılanmış olanlar (transplant ve kanser hastaları) ve diyabet gibi altta yatan hastalığı olanlarda daha ciddi seyreder (16, 91, 92, 93).

Son yıllarda virüsün virülansında bir artışın olduğu, immün sistem yetmezliğinden bağımsız olarak sağlıklı genç erişkinlerde de nörolojik tutulumun

olmasına bağlanmaktadır (94). ABD’nde nöroinvazyon oranı %30-50, mortalite oranı ise %5-10 olarak bildirilmiştir (95).

### **1.1.12. Klinik Bulgular**

Batı Nil Virüsü insanlarda, subklinik enfeksiyondan ölüme kadar uzanan farklı klinik tablolara sebep olmaktadır. BNV enfeksiyonlarının inkübasyon süresi ortalama 2-6 gün olmakla beraber, genelde 2-15 gün arasında değişir (15). İnsanda görülen BNV enfeksiyonlarının büyük bir kısmı (%80) asemptomatik seyrederek. BNV, enfekte insanların 1/5’inde (%20) Batı Nil Ateşi denilen; genellikle 3-6 gün süren ani ateş yükselmesi, baş ağrısı, sırt ağrısı, miyalji, halsizlik, anoreksi, bulantı, kusma gibi semptomlarla karakterize, sıklıkla yaygın lefadenopatinin eşlik ettiği kendini sınırlayan grip benzeri klinik tablo oluşturur (24). BNV ile enfekte insanların hemen hemen yarısında primer olarak yüz ve gövdede görülen, bir hafta süren roseolalar veya makülopapüler döküntüler ortaya çıkar (15, 24). BNV ile enfekte her 150-300 insanın yaklaşık 30’unda Batı Nil Ateşi, 1’inde ise ciddi nörolojik hastalık tablosunun geliştiği seroepidemiolojik çalışmalarla gösterilmiştir (82).

Yukarıda belirtildiği üzere BNV ile enfekte insanlarda santral sinir sistemi (SSS) tutulumuna bağlı nöroinvaziv hastalık gelişme oranı %1’den daha az oranda bildirilmiştir (16). Meningoensefalit BNV’ye bağlı SSS tutulumunda en sık görülen klinik tablodur. Ancak tek başına menenjit veya ensefalit olguları da bildirilmiştir (15). Ciddi SSS enfeksiyonu olgularında yüksek ateş, baş ağrısı, kas zayıflığı, ense sertliği, uyuşukluk, konfüzyon, koma, kas titremeleri, konvülsiyonlar görülür ve nihayetinde akut flask paralizi oluşur (14, 91). Asimetrik kuvvet kaybının görüldüğü, spinal ön boynuz hücrelerinde hasarın olduğu, duyu tutulumunun olmadığı bu klinik tablo Poliyomiyelit paralizisine benzer (91). Bununla beraber BNV’ye bağlı SSS tutulumunda nadiren duyu bozuklukları, tremor-Parkinsonizm, ataksi, kranial sinir tutulum bulguları, optik nörit ve poliradikülopati de bildirilmiştir (96).

Batı Nil Virüsü ile enfekte olguların ileri yaşta olması (50 ve üzeri yaş) invaziv nörolojik hastalık açısından en anlamlı risk faktörüdür. 1999 yılındaki New York salgınının semptom analizi ile, ciddi nörolojik hastalık insidansının 50-59 yaş

arası kişilerde 0-19 yaş arası kişilerden 10 kat, 80 yaş ve üstü kişilerde ise 0-19 yaş arası kişilerden 43 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (16). 2000 yılında İsrail’de BNV ile enfekte 417 olgu tespit edilmiştir. Bunlardan 233’ü hastanede yatarak tedavi görmüş. Bu 233 hastanın %98,3’ünde yüksek ateş, %57,9’unda baş ağrısı, %18,5’inde gastrointestinal semptomlar, %16,7’sinde koma ve %9,4’ünde nörolojik semptomlar görülmüştür. Bu hastaların mortalite oranı %14.1 olarak belirlenmiştir. BNV ile enfekte olup ölen hastaların %87.9’unun 70 ve üzeri yaşta olduğu raporlanmıştır (92). Aynı şekilde ABD’de 2000 yılında tanımlanan 19 BNV ile enfekte olguda da 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 görülmüştür (93).

Nörolojik tutulumun olmadığı BNV ile enfekte olguların tamamı iyileşirken, SSS hastalığı olanlarda uzun süren morbidite ve %10’u aşan mortalite görülmüştür (15). 1999 yılında New York’ta görülen BNV salgınında ensefalitli hastaların sadece %35’i bir yıl içinde tamamen iyileşmiş, %65’inde halsizlik, kronik baş ağrısı, hafıza kaybı, yürüme güçlüğü, kas zayıflığı ve depresyon gibi çeşitli nörolojik bozukluklar gözlenmiştir (93). Çeşitli BNV salgınları esnasında hastanede yatarak tedavi gören hastalarda ölüm yüzdeleri; Romanya’da (1996) %4, New York’ta (1999) %12 ve İsrail’de (2000) %14 olarak raporlanmıştır (16, 19). Aynı oranlar 70 yaşın üzeri hastalar için ise; Romanya’da %15 ve İsrail’de %29 olarak rapor edilmiştir (19, 20).

Erişkinleri ve ileri yaştakileri daha fazla etkilemesi, ensefalit olgularının %10’unun ölümle sonuçlanması BNV’nin önemli bir özelliğidir (97). İleri yaş ve organ transplantasyonu sonrası immüsupresyon dışında ciddi nöroinvasiv BNV enfeksiyonu için başka risk faktörleri henüz bildirilmemiştir. Hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, diyabet olası predispozan faktörler olarak düşünülebilir. Ağır hastalık için genetik yatkınlık farelerde tanımlanmıştır. Ancak aynı durum insanlarda açığa kavuşturulamamıştır (98).

Batı Nil Virüsü ile enfekte insanlarda nadiren hepatit, pankreatit, miyokardit, pnömoni, rabdomiyoliz, orşit, koryoretinit gibi nörolojik olmayan ciddi

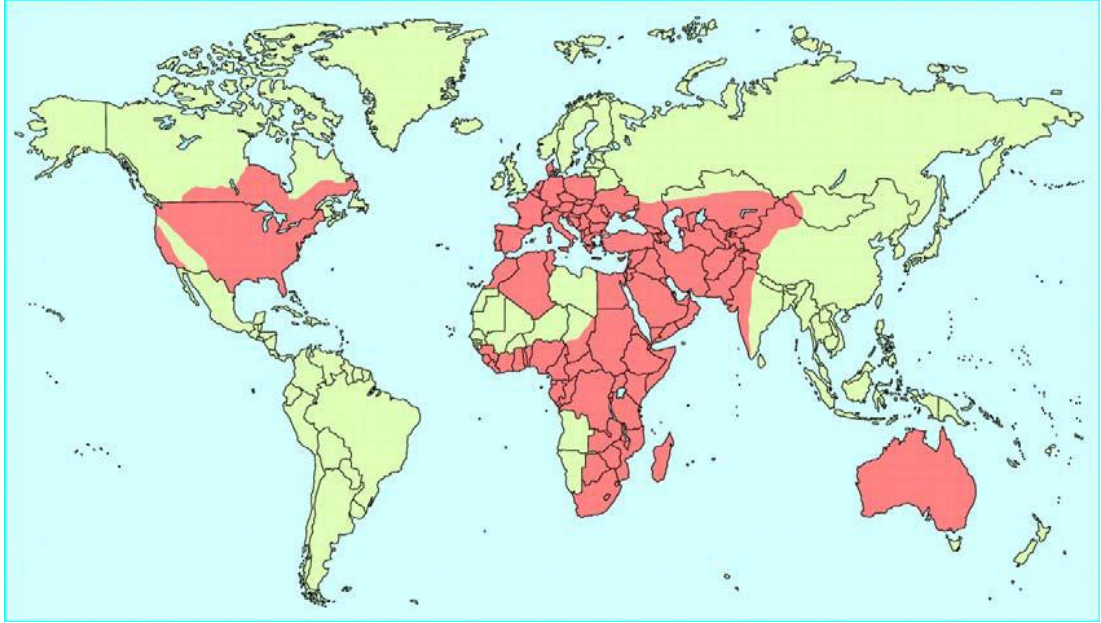
komplasyonlar da görülebilir. Kuzey Amerika'da bazı hastalarda kardiyak disritmi saptanmıştır (24, 96).

### **1.1.13. Persistan Enfeksiyon**

Batı Nil Virüsü'nn immün kompetan konaklarda persistan enfeksiyon yaptığı maymunlar, hamsterler ve kuşlarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. BNV'nin infekte hayvanların idrarında kronik olarak bulunduğu ve böbreklerde persistan enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Flavivirslerin farklı türlerinde olan bu özelliğin nadir de olsa BNV'de de olduğu belirtilmiştir (99). Aynı şekilde BNV RNA'sının enfeksiyonlarından sonra 7 yıla kadar ve kovelesan dönemdeki hastaların %20'sinin idrarında tespit edildiği rapor edilmiştir. Bu özellik BNV'nin renal patoloji ile ilişkili olabilen persistan böbrek enfeksiyonu yaptığını göstermektedir (100). Persistan Flaviviral enfeksiyonlardan, bu virüslerde meydana gelen mutasyon gibi genetik değişiklikler, defektif viral partiküller (defective interparing particle, DIP), defektif RNA, ısıya duyarlı mutasyonlar ve plak oluşturmayan mutantlar sorumlu tutulmaktadır (63, 99).

### **1.1.14. Coğrafi Dağılım**

Batı Nil Virüsü vektörlerle bulaşan virüsler arasında dünyada en yaygın görülen bir arbovirstr. Coğrafi dağılımının bu kadar genişlemesine iklim değişikliklerinin yanı sıra artan taşımacılık (insan, hayvan, bitki vs.), vektör kontrol programlarının yetersizliği, şehirleşme projeleri ve askeri aktiviteler gibi insan aktivitelerinin de katkısı olduğu düşünülüyor (101). İklm ve bitki örtüsü gibi vektörlerin yaşam döngüsünü etkileyen koşullar, duyarlı insan/hayvan popülasyonlarının büyüklüğü, uluslararası seyahatler, kargo, insan kaynaklı çevresel değişiklikler ve doğal dengenin bozulması gibi çok sayıda faktör tarafından etkilenir (**şekil 9**) (14, 28).



**Şekil 9.** Batı Nil Virüsü'nün coğrafi dağılımı, 2003 (14)

Batı Nil Virüsü Avrupa, Afrika, Asya ve Avusturalya'da endemiktir (14, 28). Virüsün insidansı Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz havzasının ılıman iklime sahip bölgelerinde mevsimsel özellik gösterir, BNV'nin en yüksek viral aktivitesi temmuz-ekim ayları arasında görülür (12, 53). ABD'de virüsün güneye yayılımıyla birlikte insan olgularının saptandığı süre nisan-aralık aylarını da içine alacak kadar genişlemiştir (12). Güney Afrika'da ise yılın ilk ilkbahar ve yaz yağmurları ile bulaşta artış izlenir (102).

Batı Nil Virüsü endemik bölgelerde insan ve at popülasyonlarını etkileyen geniş salgınlara da yol açar. Nitekim Güney Afrika'da 1994 yılında Cezayir'de 50 insan olgusu; 1996 ve 2003 yıllarında Fas'ta sırasıyla, 94 ve 9 at olgusu ve 1997'de Tunus'ta 173 insan olgusu bildirilmiştir (103, 104, 105). Mısır'da genel popülasyonda BNV seroprevalans ortalama %24 olarak bildirilmiştir (106).

Yaklaşık 500 olgu ve bu olguların %10'a ulaşan ölüm oranı ile Avrupa'daki en büyük arboviral salgın, Romanya'nın Bükreş kentinde 1996-97 yılları arasında

görülen BNV salgınıdır (107). Rusya'nın Volgograd Bölgesi'nde 1999 yılında ortaya çıkan büyük salgında da 800'den fazla kişi hastaneye yatırılmış, 40'ı ölmüş, 2005-2007 yılları arasında da Rusya'nın farklı bölgelerinde epidemiler izlenmiştir (108, 109). Macaristan'da da 2003-2008 yılları arasında 18 BNV olgusu tespit edilmiştir (110). Türkiye'ye en yakın coğrafya olan Yunanistan'da ise, en yakın tarihli Avrupa'daki BNV salgını 2010 temmuz-ağustos ayları arasında bildirilmiştir. Bu salgında nöroinvaziv 81 olgu bildirilmiştir. Özellikle 50 yaş üzerindeki hastalarda ensefalit, menenjit ve meningoensefalit bulgularının görüldüğü bu salgındaki olguların yaş ortalaması 70 olarak rapor edilmiştir (111).

Batı Nil Virüsü'nün Orta Doğu'da en çok bildirildiği ülke 1950 yılından bu yana BNV'nin gündemde olduğu İsrail'dir (50, 56, 112). İsrail popülasyonunda BNV seroprevalansı %27 olup, İsrail'deki ilk salgın 1957'de, son salgın ise 2002'de bildirilmiştir (12, 57).

Amerika kıtasında ilk defa New York'ta Ağustos 1999'da ortaya çıkan Batı Nil Virüsü, insan ve at ensefalit olguları, kuş ölümü ile seyreden salgına sebep olmuştur (12). Amerika'da görülen bu BNV suşunun (NY99), 1998 İsrail suşu ile yüksek homoloji (%99.8) göstermesi, virüsün kıtalararası yolculuk ile Yeni Dünya ülkelerine ulaştığını ve kaynağın İsrail olduğunu telkin etmiştir (20, 21, 34, 112, 113). BNV'nin Amerika'ya ulaşması viremik kişilerin uçak ya da gemi ile New York'a seyahati, enfekte kuşların ithali ve sivrisineklerin farklı formlarının (yumurta, larva veya erişkin) kargo ile uçak veya gemi aracılığı ile taşınması ihtimaller arasında sayılmaktadır. Bunlardan birinci ihtimal insanda viremi süresinin kısa ve viremi esnasında kandaki virüs düzeyinin düşük olması nedeniyle fazla itibar görmemekte; diğer iki ihtimal daha çok ön plana çıkmaktadır (53, 113, 114).

Batı Nil Virüsü'nün Amerika'ya yayılmasıyla 2002 yılında 4.156 insanın 284'ü, 14717 atın 4500'ü ve 13000'den fazla kuş ölmüştür (50). Gittikçe Kanada ve Orta-Güney Amerika'ya da yayılan BNV, 1999-2009 yılları arasında yaklaşık 29.600 insandan 1423'nün ve 27.000'den fazla attan yaklaşık 9.000'inin ölümüne sebep olmuştur (12, 18, 50). ABD salgınında virüsün, kuzgun ve karga gibi türlerde (Corvidae), diğer salgınlarda rastlanmadığı ölçüde letal enfeksiyon yaptığı belirtilmiştir (20). BNV'nin NY99 suşlarındaki kargalar için yüksek virulanstan, NS3 helikaz proteininin 249. pozisyonundaki bir aminoasit değişikliği sorumlu tutulmuştur

(115). Bu NS3-T249P mutasyonunun, üç farklı yerde farklı zamanlarda ortaya çıktığı ve bu dönemlerde insan salgınlarına da yol açtığı tespit edilmiştir (28). Kuşlarda daha uzun süreli ve yüksek düzeyli viremi oluşturan ve yüksek virülan olan bu NY99 suşu, kuşların sivrisinekler ve dolayısıyla da insanlar için kaynak teşkil etme rollerini de arttırmaktadır. 2002 salgınında WN02 genotipi, NY99 suşunun yerini almış ve Kuzey Amerika'da WN02 suşu predominant hale gelmiştir (24). WNO2 genotipi daha yüksek ısılarda NY99 suşundan çok daha hızlı yayılma özelliğindedir. Bu özellik viral zarfta bulunan E proteininin 159. aminoasidindeki mutasyon sonucu kazanılmıştır (68).

#### **1.1.15. Türkiye’de Durum**

Türkiye, BNV için endemik sayılabilecek bir coğrafyada bulunmaktadır. Nitekim coğrafi açıdan Türkiye, BNV salgınlarının olduğu ve insan-hayvan BNV olgularının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakın ilişkili bir konumda yer almaktadır (**Şekil 9**). Hem Ortadoğu hem de Avrupa’da benzer iklim şartlarını paylaşan ülkelerde hastalığın görülmesi ve bu ülkeler ile aramızda turizm ve ticari ilişkilerin olması, BNV’nin Türkiye’de mevcudiyeti konusunda kuvvetli şüpheler uyandırmaktadır. Ülkemizde BNV varlığı ile ilgili olarak ilk resmi açıklama, Ağustos 2010’da T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılmasına rağmen insan ve hayvanların BNV maruziyeti üç dekattan uzun süredir araştırılmaktadır (21, 116). Ülkemizde ilk defa 1964’te insan arbovirüs enfeksiyonlarla ilgili, Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü’nden Heperkan ve Arı tarafından yapılan bir çalışmada İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır’dan toplanan 559 serum örneğinde hemagglütinasyon inhibisyon yöntemiyle arbovirüslere karşı oluşan antikorlar araştırılmış ve arbovirüslerle meydana gelen bir hastalığın varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada yaşın ilerlemesiyle seropozitifliğin arttığı da rapor edilmiştir (117).

İzmir ve civarında 1966 yılında Serter F. tarafından menengial irritasyon bulgularıyla başvuran hastaların 1/3’ünde viral ajanların hastalık etkeni olduğu ve bunların çoğunluğunun da Arbovirüs kaynaklı olduğu klinik ve laboratuvar parametrelerle tespit edilmiştir (118). 1971’de Radda, 214 evcil hayvan ve serbest yaşayan fare üzerinde çeşitli artropod kaynaklı virüse karşı antikor araştırılmış ile ilgili bir çalışma yapmış ve ileri doğrulama için nötralizasyon testlerini kullanmıştır.

Bu çalışma ile BNV maruziyet oranı koyunlarda Ankara'da 9/45, Hatay'da 1/110 olarak saptanmıştır (116).

Oysaki Türkiye'de, BNV varlığının ilk serolojik kanıtı 1970'li yılların ikinci yarısında Güney Doğu Anadolu bölgesinde yapılan çalışma ile gösterilmiştir (119). Bu çalışmada, 937 kişinin serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon (HI) yöntemiyle BNV seropozitifliği araştırılmış ve %42.8 gibi oldukça yüksek oranda pozitiflik tespit edilmiştir. Bu seropozitifliğin yaşla birlikte arttığı vurgulanmıştır (119). Aynı şekilde Batı Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'nun çeşitli illerinde hemaglutinasyon inhibisyon testi kullanılarak BNV varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmalarda virüs nötralizasyon testi ile doğrulanmış olup elde edilen yüksek oranlar, gruba özgül antikor varlığı şeklinde bildirilmiştir (116, 119). Bu çalışmalarda elde edilen verilerin, Flavivirüsler arasında izlenen ve hemaglutinasyon inhibisyon yöntemi gibi gruba özgül testlerde ortaya çıkan antijenik çapraz reaksiyonlara bağlı olduğu vurgulanmıştır (120).

Serter'in Ege bölgesinde 1980'da yaptığı çalışmada da toplanan serumların 231'inde yani %21.5'inde nötralizan immünglobülinler gösterilmiştir (121). Yine Serter'in Ege bölgesinde 1980 yılında HI yöntemiyle yaptığı çalışmada BNV seropozitifliği %29.1 oranında saptamıştır (121).

Özkul ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada, Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa, Bursa ve Ankara'yı içeren 10 ilden insan ve çeşitli hayvanlardan alınan 764 serumda BNV'ye karşı gelişen nötralizan antikorlar araştırılmıştır. Bu çalışma ile köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, sığırlarda %4, katırlarda %2.5, koyunlarda %1 ve insanlarda %20.4 oranında BNV seropozitifliği tespit edilmiştir (122). 2007'de Ergünay ve arkadaşlarının 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 BNV pozitiflik rapor edilmiştir (123). Aynı şekilde Hızel ve arkadaşları da Ankara'da Gazi Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 2.821 kan donöründe BNV seropozitifliğini Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile araştırmış ve %2.4 oranında BNV seropozitifliğini raporlamış, ancak bu çalışmada seropozitiflikler nötralizasyon testi ile doğrulanmamıştır (124). 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 %0.56'ya düşmüştür (125).

Ülkemizde 2010 yılı Ağustos ayında Manisa Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde nedeni açıklanamayan viral ensefalit ön tanılı hastaların laboratuvar tetkikleri "Batı Nil Virüs Enfeksiyonu" tanısı ile sonuçlanmıştır. 08.09.2010 tarihinde yapılan ilk resmi açıklamanın ardından toplam 7 vakanın 3'ü ölmüş. Sağlık Bakanlığı tarafından 14.09.2010 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirilmiştir. Böylece Türkiye'den ilk kez resmi yolla "Batı Nil Virüsü Enfeksiyonu" bildirim yapılmıştır (126).

Sonuç olarak; bütün bu verilere dayanarak ülkemizde düşük de olsa BNV'nin varlığı söz konusu olmuştur. Memelilerin çoğunluğunda BNV, ya da benzer bir virüse maruziyet gösterilmiştir. Bu durum aktif hastalık yokluğunda virüsün uzun dönem varlığını sürdürmesine bağlanmaktadır (116).

#### **1.1.16. Tanı**

Batı Nil virüsüne bağlı SSS enfeksiyonlarının tanısı, klinik bulguların laboratuvar sonuçlarıyla uyumlu olması sonucu konulur (16). Ateş ve açıklanamayan nörolojik belirtiler, halsizlik, kaslarda güçsüzlük, eritematöz döküntü ve baş ağrısı ile BNV'nin endemik olduğu bölgelerde, ilkbaharın sonu ile sonbahar başında ya da sıcak iklimlerde yılın herhangi bir döneminde hastaneye başvuran hastalarda BNV enfeksiyonunun ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Bu amaçla, tam kan sayımı, BOS hücre sayımı, glukoz ve protein düzeyi testleri; BNV serolojisi, beyin görüntüleme yöntemleri (MR gibi...), EEG (Elektroensefalografi) ilk etapta önerilen tetkiklerdendir (20). Batı Nil Ateşi için CDC tarafından bildirilen klinik hasta tanımı şöyledir: Ateş, baş ağrısı, halsizlik, deri döküntüsü (bazen), lenfadenopati (bazen), göz ağrısı (bazen) olan hastalar. Ayrıca BNV'nin neden olduğu menenjit, ensefalit ve poliomyelit gibi nöroinvaziv hastalık için ek olarak ense sertliği, bilinç kaybı, mental bozukluk, letarji, konfüzyon veya koma, fokal nörolojik bulgular, asimetrik ekstremitte paralizisi, miyelit, poliradikülit, gastrointestinal semptomları olan hastalardır (127).

BNV'ye bağlı nöroinvaziv hastalığı olanlarda hafif düzeyde lökositoz ya da lenfositopeni saptanabilir (127). Özel olarak belirtmek gerekirse BNV ensefalitli olgularda hiponatremi, tespit edilebilen bir laboratuvar bulgusudur (14, 15). BNV

kaynaklı meningoensefalit olgularının BOS bulguları; pleositoz (ortalama 30-100 hücre/ $\mu$ l, lenfosit baskın), hafif-orta düzeyde protein artışı ve normal glukoz düzeyi olarak belirtilmiştir (15, 127).

Rutin klinik bulgular ve laboratuvar testleri BNV enfeksiyonunun diğer viral etkenlerden ayırıcı tanısında yetersiz kaldığından BNV, özgül virolojik yöntemlere doğrulanmalıdır. Bunun için kan veya BOS'ta BNV'ye özgül antikorların veya viral RNA'nın gösterilmesi şarttır (15, 128, 129). Viremi düzeyi düşük ve kısa süreli olduğu için kandan BNV'nin izolasyonu genellikle başarısız olmaktadır (**Şekil 10**) (14, 15, 18, 24). Buna rağmen nörolojik tutulum için viral yükün yüksek olması, duyarlılıkları düşük de olsa nükleik asit testlerinin önemini artırmıştır (130, 131).

#### **1.1.16.1. Antijen testleri**

Kuzey Amerika'da özellikle sivrisinekler ve ölen kuşlar için uygulanan sürveyans programında kullanılmak üzere Batı Nil Virüsü antijen saptama testleri, geliştirilmiştir (18). Bunlardan Vec-Test BNV antijen testi, ticari olarak bulunabilen dip-stick formatında koloidal golda çekilen, türe spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak enfekte sivrisineklerde BNV'nin niteliksel tayinini amaçlayan hızlı bir immunokromatografik testtir (132, 133). Aynı zamanda ekonomik, uygulaması kolay ve 15 dakika gibi kısa sürede sonuç veren dipstick ve kaset testleri de ticari olarak bulunmaktadır. Bu yöntemlerin özgüllükleri oldukça yüksek (%95) olmasına rağmen, duyarlılığı düşük (%60-80)'tür (18). Fakat insan örneklerinde kullanılan antijen testleri mevcut değildir (21).

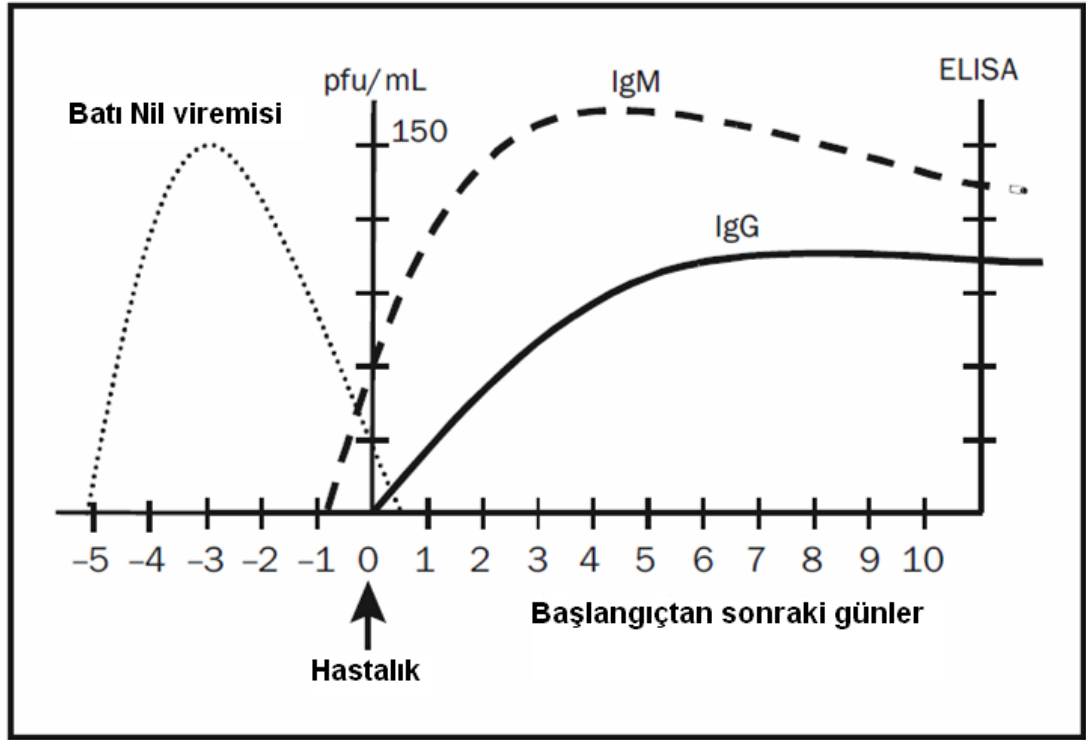
#### **1.1.16.2. Serolojik testler**

Batı Nil Virüsü kaynaklı enfeksiyonların teşhisinde serolojik inceleme yöntemleri sık kullanılmaktadır (30). BNV'ye karşı oluşan antikorları tespit etmek için indirekt IgG ELISA, IgM antikor yakalama enzim immünoassay (MAC-ELISA), indirekt fluoresan antikor testi (IFAT), plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) gibi yöntemler genellikle kullanılır. Gruba özgül ve total antikorları tespit etmek için kullanılan hemaglutinasyon inhibisyon ve kompleman birleşmesi gibi testlerin duyarlılıkları daha düşük olduğu için kullanımları yaygın değildir. Antijen kaynağı ve test platformuna bağlı olarak ELISA ve IFAT yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinde farklılıklar gözlenir. Virüsün hücre kültürlerinde oluşturduğu

sitopatik etkinin incelenmesi esasına dayanan PRNT yöntemi ise antikor özgüllüğünün belirlenmesinde kullanılan bir doğrulama testidir. (24, 132, 134).

Batı Nil Virüsü enfeksiyonunda özgül IgM antikorları 2-8 gün içinde pozitifleşir, enfeksiyondan sonra 2 hafta yüksek kalır ve birkaç hafta ya da ay içinde kaybolur (**Şekil 10**) (18). Ancak bazı olgularda serum IgM antikorları, 1 yıldan daha uzun süre kalabilir (18). Nöroinvaziv BNV hastalığı olanlarda ise IgM, SSS bulgularının başladığı genellikle 8. günde serum ve BOS'ta saptanabilir (135). BNV ensefaliti geçiren ve iyileşen hastaların %36'sında 12 ay, %20'sinde ise 16 ay boyunca serum IgM pozitifliğinin devam ettiği, bazı hastaların BOS'unda ise IgM düzeyinin 199 günden fazla saptandığı bildirilmiştir (136, 137). IgG antikorları ise, genellikle hastalık semptomlarının başlangıcından sonra 12. günde, yani IgM'nin pozitifleşmesinden birkaç gün sonra, serumda saptanabilir düzeye ulaşır ve üç hafta boyunca göreceli olarak yükselip uzun yıllar kalıcı olabilir (**Şekil 10**) (15, 18).

Batı Nil Virüsü'nün laboratuvar tanısında en etkili yol; klinik bulguların görüldüğü 8-14. günlerde alınan serum veya 8. günden sonra alınan BOS örneğinde IgM antikorlarının MAC-ELISA (IgM-Antibody Captured-ELISA) yöntemiyle araştırılmasıdır (127). Bu yöntem, ticari olarak temin edilebilir, kolay uygulanabilir ve duyarlılığı yüksek (%95) bir yöntemdir (20).



Şekil 10. Batı Nil Virüsü'nün serolojik ve viral gösterge grafiği (15)

BNV'ye karşı oluşan IgM antikorları, kan-beyin bariyerini geçemediğinden, BOS'ta BNV IgM pozitifliği, SSS enfeksiyonunu kuvvetle doğrular (127, 129). Fakat serumda BNV IgM pozitifliğini dikkatli yorumlamak gerekiyor (20, 127, 138). Örneğin, klinik belirtilerin görülmesinden sonraki ilk 72 saatte IgM varlığının araştırılması antikor yanıtının kinetiği nedeniyle yalancı negatif sonuç verebilir (20, 138). Aynı şekilde BNV IgM; Japon ensefaliti, St.Louis ensefaliti, Dengue, sarı humma gibi diğer akraba flavivirüslerle çapraz reaksiyona girdiğinden yalancı pozitif sonuçlar verebilir (127, 128). Ayrıca diğer birçok enfeksiyonun aksine BNV'ye karşı oluşan IgM antikorları, serumda bir yıla kadar hatta daha uzun süre kalıcı olduğu için bir tek serum örneğinde IgM pozitifliği akut BNV enfeksiyonunu için yetersizdir (15, 130). Dolayısıyla BNV kaynaklı akut enfeksiyon teyidi için, hastadan en az 14 gün sonra alınan serum örneğinde 4 kat ve üzerinde titre artışı olması gerekmektedir (18, 127, 131). CDC tarafından önerilen BNV doğrulama kriterleri şunlardır (131):

- Doku, kan, BOS ve diğer vücut sıvılarından BNV'nin izolasyonu ya da bu örneklerde BNV antijenlerinin veya genom dizilerinin gösterilmesi.
- BOS örneğinde MAC-ELISA ile BNV IgM antikorlarının gösterilmesi.

- Uygun zaman aralıkları ile alınmış çift serum (en az 14 gün arayla alınmış) ve BOS örnekleri arasında BNV'ye özgü nötralizan antikor titresinde en az 4 katı artışın olması ve plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile doğrulanması.
- Tek bir serum örneğinde, MAC-ELISA ile BNV IgM pozitifliği ile birlikte, ELISA ile saptanmış ve PRNT ile doğrulanmış IgG pozitifliği.

Batı Nil virüsüne özgü antikor tespitinde indirekt immünofloresan antikor (IFA) ve hemagglütinasyon inhibisyon (HI) testleri de yer almaktadır (127, 131). Fakat, flavivirüslerle antijenik benzerlikten dolayı ELISA, IFA veya HI gibi yöntemlerle saptanan antikor pozitifliği, en özgül test olan plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ile doğrulanmalıdır (15, 18, 20, 127, 131, 139). BNV'nin serolojik tanısında kullanılmak üzere son yıllarda, "optik fiber immunoassay" ve "mikrosfer floresans immunoassay" gibi yöntemler de geliştirilmiştir (18).

#### **1.1.16.3. Moleküler testler**

Batı Nil Virüsü'nün teşhisinde, kan, BOS ve dokularda viral RNA'nın tespiti için nükleik asit amplifikasyon testleri kullanılabilir (18, 24, 140, 141). Kullanılan moleküler yöntemler arasında gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nükleik asit dizi temelli amplifikasyon en duyarlı olanlardır. Bu yöntemlerin viral RNA'yı saptama düzeyinin ( $\geq 50$  kopya/ml) hücre kültüründen 1.000 kat daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (141). Bir çalışmada, BNV meningoensefaliti olan hastalarda RT-PCR yönteminin BOS ve serum örneklerindeki duyarlılığı sırasıyla %57 ve %14 olarak raporlanmıştır (140). ABD'de gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi 2003 yılından beri donör serumlarının taranması amacıyla da kullanılmaktadır (18).

#### **1.1.16.4. Virüs izolasyonu**

Batı Nil Virüsü'nün tanısında altın standart yöntem virüsün klinik örneklerden izolasyonudur. Fakat nöroinvasiv BNV enfeksiyonu olanlarda, nörolojik bulgular ortaya çıkınca viremi düzeyi çok düşük ya da sonlanmış olduğundan virüs genellikle izole edilememektedir (15, 18). Buna rağmen beyin ve diğer solid dokuların otopsi materyallerinden virüs izole edilebilir. Bu tür çalışmaların

biogüvenlik düzeyi-3 (Biosafety Level-3, BSL-3) olan laboratuvarlarda yapılması gerekmektedir (127, 131). Bu amaçla devamlı hücre kültürlerinde (Vero, BHK-21 gibi...) ve süt emen farelerde Batı Nil Virüsü kolayca üretilmektedir (26, 49). Hücre kültüründe sitopatik etkinin görülmesi durumunda, RT-PCR veya özgül monoklonal antikorların kullanıldığı IFA yöntemleri ile virüs üremesi doğrulanmalıdır (21).

### **1.1.17. Tedavi**

Batı Nil Virüsü'nün bilinen spesifik bir tedavisi yoktur. Başlıca tedavi şekli semptomatik ve destekleyici tedavidir (16). BNV'nin sebep olduğu baş ağrısı, ateş, bulantı-kusma gibi semptomları önlenmek için analjezik, antipiretik ve antiemetik ilaçlar kullanılabilir (15, 20). Ensefaliti veya paralizisi olan hastalar, kafa içi basınç artışı açısından gözlem altında tutulmalı, solunum yetmezliği gelişirse monitörize edilmelidir (15, 20). BNV ensefalitinde nöronların dejenerasyonu ve ölümü sonrası gelişen serebral ödem en sık ölüm sebebidir. Fakat bu ödem veya hasar için spesifik bir tedavi yoktur. Sıklıkla beyin ödemi çözmek için kullanılan steroid ve mannitol gibi osmotik solüsyonların BNV'nin sebep olduğu beyin ödemi ve herniasyonun tedavisi için kısa süreli kullanımları önerilmektedir. Fakat bunların BNV ensefalitinde proflaktik tedavide kullanılmasına ilişkin kontrollü bir çalışma mevcut değildir (142).

Ribavirin, alfa-interferon (IFN- $\alpha$ ) ve pirazidin nükleozidleri gibi antiviral ajanların BNV'na karşı in vitro aktiviteleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (143, 144). Ayrıca bazı araştırmacılar BNV Meningoensefalitli olguların IFN- $\alpha$ 2b ile başarıyla tedavi edildiğini bildirmiştir (145, 146). Fakat bu ajanların in vivo kullanımı ile ilgili destekleyici kontrollü klinik veriler mevcut değildir (21).

Farelerde yapılan çalışmalarda Batı Nil virüsüne özgül antikorları içeren immünoglobulin uygulamasının da, BNV enfeksiyonlarında proflaktik ve terapötik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiş ve salgınlarda insanlara uygulanan hiperimmüngamaglobulin ile de aynı etki gösterilmiştir (147, 148, 149).

### **1.1.18. Korunma**

BNV'nin kontrol altında tutulması ve önlenmesi için çevredeki mevcut olguların, atlardaki enfeksiyonun ve kuşlardaki ölümlerin izlenmesi, sivrisinek larva

haritasının bilinmesi ve güncellenmesi, yetişkin sivrisinek kontrolünün sağlanması ve bireysel risklerin azaltılmasıdır (150).

Henüz spesifik bir tedavisi ve aşısı olmayan BNV'nin yayılımını önlemek için sivrisineklerle temastan korunmak ve sivrisinek popülasyonunun kontrolü kilit noktadır. BNV aktivite alanları kuşlar, insanlar ya da hayvanlar için belirlenmeli sivrisinek kontrol programları oluşturmalı ve bu alanlardaki su birikintilerinde larvasid uygulamaları, erişkin formda ise sprey uygulamaları yapılmalıdır (15, 151).

İnsanlar kadar atlar da sivrisineklerden korunmalıdır. Sivrisineklerin üreme alanları sınırlandırılmalıdır. Sivrisineklerin en çok aktif olduğu gün batımı ve şafak vaktinde, böcek kovucular ve perdelerle insanlar sinek ısırmasına karşı korunmalıdır (151).

Üzerinde durulması gereken bir başka nokta da; bir bölgede kuş ya da at ölümlerinde dikkat çekecek derecede artış olduğunda veteriner hekimler ve ilgili sağlık kuruluşları bilgilendirilmelidir. Giysi altına kullanılan sivrisinek kovuculardaki DEET (N,N-dietil-m-toluamid) konsantrasyonu yetişkinler için %35'den fazla, çocuklar için ise %10'dan fazla olmamalıdır. Sivrisinek kovucular dışarıya çıkarken temas edebilecek her yere uygulanmalı ve günlük olarak ciltten yıkanmalı, gerek duyulduğunda tekrar kullanılmalıdır (15, 117, 151).

### **1.1.19. Aşı**

Günümüzde insanlar için BNV'ye karşı lisans almış bir aşı henüz mevcut değildir (152). Buna karşın, atlarda kullanılmak için lisanslı aşılar mevcuttur (18). Bunlardan biri, 2003 yılında lisans almış formalin ile inaktive edilmiş inaktif BNV aşısıdır, diğeri ise 2004 yılında lisans almış rekombinant canlı Recombitec (canarypox) virüs aşısıdır (18). Bu iki aşının atlarda viremiye karşı %95-100 arasında koruyucu olduğu belirtilmiştir (21).

İnsanlar için inaktive, rekombinant canlı virüs, alt ünite ve DNA aşı çalışmaları devam etmektedir (18, 152). Nötralizan antikörlerin uyarımında en önemli antijenler olan prM ve E yapısal proteinlerini kodlayan genler rekombinant BNV aşısında primer hedefdir. Ayrıca prM-E alt ünitelerinden oluşan ve enfeksiyöz olmayan virüs benzeri partiküller aşı yapımında kullanmak için çalışılmaların hedefi olmuştur (48).

BNV aşısında arzulanan hedef hem hümoral hem de hücrel immün yanıtın oluşturulmasıdır. Fakat bu etkiyi oluşturan canlı atenue BNV aşısı insanlar için riskli görülmektedir. Ancak canlı atenue aşılar gibi in vivo olarak replike olabilecek, kuvvetli nötralizan antikor yanıtı oluşturabilecek, viremiyi önleyebilecek ve bir tek immünizasyon ile etkin korumayı sağlayabilecek değişik genetik kökenli kimerik aşılar umut vaat etmektedir (18). Günümüzde uzun zamandır uygulanan, güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmış sarıhumma virüsü (YFV) 17D aşısının vektör olarak kullanıldığı kimerik BNV aşısı üzerinde çalışmalar devam etmektedir (153). Bunun için YFV 17D aşısı suşunda YF-prM/E genlerinin yerine WN-prM/E gibi BNV yapısal protein genleri yerleştirilmektedir. Bu çalışma faz I/II aşamasında olup başarılı sonuçların alındığı söylenmektedir (153). Bir başka canlı atenue kimerik BNV aşısı ise, WN-prM/E genlerinin Dengue tip 4 virüsüne entegrasyonu ile yapılan aşıdır (154).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Ocak 2013-Mayıs 2015 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi (FÜH)'nde, santral sinir sistemi enfeksiyonu ön tanısıyla tedavi gören ve herhangi bir patojen mikroorganizma tespit edilemeyen hastaların, hastanenin merkez laboratuvarına gönderilen rutin kan ve BOS örnekleri toplandı. Yaş, cinsiyet ve gönderilen servis ayırımı yapılmaksızın kırk yedi (47) hastanın 94 örneği (47'si BOS ve 47'si kan) değerlendirilmeye alındı. Bu örnekler, ELISA yöntemiyle BNV'ye karşı IgM ve IgG tipinde antikor varlığını arştırmak ve RT (Real Time)-PCR yöntemiyle nükleik asit varlığını arştırmak amacıyla çalışmaya dahil edildi. Biyokimya tüpünde gelen kan örnekleri 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. BOS ve serum örnekleri steril pipet uçları kullanılarak steril burgulu kapaklı ependorflara aktarılıp numaralandırıldı. Çalışma gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çalışmamızın etik kurul onayı Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulundan alınmıştır.

## **2.1. Örneklerinin Çözülmesi**

Derin dondurucuda  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen BOS ve serum örnekleri benmaride  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çözüldü. Çözülen örnekler çalışma yapılıncaya kadar oda ısısında tutuldu.

## **2.2. ELISA Yöntemiyle BNV IgG ve IgM tipi antikorların Tespiti**

BOS ve Serum örneklerinde BNV varlığının araştırılması için BNV antikorlarını bulmaya yönelik ticari Anti-West Nile Virus IgG (Euroimmun, Almanya) ve Anti-West Nile Virus IgM (Euroimmun, Almanya) ELISA kitleri kullanıldı. Testlerin prensibi; BNV antijenleri (BNV ile enfekte hücre lizatu) ile kaplı mikropalak kuyucuklarına örneklerin eklenmesi ve özgül IgG veya IgM varlığında gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin, ikinci bir antikor sistemi (enzimle işaretleli anti-insan IgG veya IgM konjugatı) kullanılarak saptanması esasına dayanır. 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.

Bu ELISA çalışmaları üretici firmanın belirttiği test prosedürüne uygun olacak şekilde Grifols Triturus tam otomatik ELISA cihazında gerçekleştirildi.

### **2.2.1. Anti-West Nile Virus IgG ELISA yönteminin çalışma prosedürü**

1. ELISA plağında test prosedürüne uygun olarak, pozitif ve negatif kuyucuklar için ikişer kuyucuk ayrıldı. İlk 2 kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, ikinci 2 kuyucuğa 100 µl negatif kontroller konuldu.

2. Örnekler kit içerisinde bulunan tampon solüsyonu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Bu işlem için her örnekten 10 µl alındı, 100 µl tampon solüsyonu içerisine karıştırılıp vortekslendi.

3. Hazırlanan bu tampon karışımından mikroplağa 100'er µl pipetlendi ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonunda 450 µl yıkama tomponu ile tüm kuyucukların 3 defa yıkanması sağlandı.

5. Mikroplağın her kuyucuğa 100'er µl peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-human IgG solüsyonu (konjugat) eklenerek 23°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. İnkübasyon sonunda 450 µl yıkama tomponu ile tüm kuyucukların 3 defa yıkanması sağlandı.

7. Tüm kuyucuklara 100'er µl chromogen/substrate solüsyonu eklendi ve 23°C'de 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

8. İnkübasyon sonunda 100 µl stop solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içinde mikroplaklar 450 nm ve 620 nm dalga boyunda spektrofotometrik ELISA okutucusunda değerlendirildi.

### **2.2.2. IgG için Cut-off hesaplanması**

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

### **2.2.3. Anti-West Nile Virus IgM ELISA yönteminin çalışma prosedürü**

1. ELISA plağında test prosedürüne uygun olarak, pozitif ve negatif kuyucuklar için ikişer kuyucuk ayrıldı. İlk 2 kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, ikinci 2 kuyucuğa 100 µl negatif kontroller konuldu.

2. Örnekler kit içerisinde bulunan tampon solüsyonu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Bu işlem için her örnekten 10 µl alındı, 100 µl tampon solüsyonu içerisine karıştırılıp 23°C’de 10 dakika bekletildi.

3. Hazırlanan bu tampon karışımından mikroplağa 100’er µl pipetlendi ve 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonunda 450 µl yıkama tomponu ile tüm kuyucukların 3 defa yıkanması sağlandı.

5. Mikroplağın her kuyucuğa 100’er µl peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-human IgM solüsyonu (konjugat) eklenerek 23°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. İnkübasyon sonunda 450 µl yıkama tomponu ile tüm kuyucukların 3 defa yıkanması sağlandı.

7. Tüm kuyucuklara 100’er µl chromogen/substrate solüsyonu eklendi ve 23°C’de 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

8. İnkübasyon sonunda 100 µl stop solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içinde mikrolaklar 450 nm ve 620 nm dalga boyunda spektrofotometrik ELISA okutucusunda değerlendirildi.

#### **2.2.4. IgM için Cut-off hesaplanması**

Sonuçların değerlendirilmesi mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olacak şekilde kantitatif olarak belirlendi. Antikor değeri  $\geq 1,1$  olarak bulunan örnekler pozitif,  $\geq 0,8$  -  $< 1,1$  arasında bulunan örnekler şüpheli pozitif (sınırdaki),  $< 0,8$  bulunan örnekler ise negatif olarak kabul edildi.

### **2.3. Real Time PCR Yöntemiyle Batı Nil Virüsü Tespiti**

Real-time PCR yöntemi ile BNV varlığı virüse ait RNA’yı tespit etmeye dayalı ticari olarak temin edilen kit ile yapıldı (Primerdesign™ genesig® Kit for West Nile Virus (WNV) Qiagen, Almanya).

### 2.3.1. Kit İçeriği

- BNV spesifik primer / prob karışımı (150 reaksiyon) FAM etiketli
- BNV pozitif kontrol şablonu (Standart eğri için)
- İnternal ekstraksiyon kontrol primer / prob karışımı (150 reaksiyon) standart olarak VIC etiketli
- İnternal ekstraksiyon kontrol RNA (150 reaksiyon)
- Endojen kontrol primer / prob karışımı (150 reaksiyon) FAM etiketli
- BNV / İnternal ekstraksiyon kontrolü / endojen kontrol RT primer karışımı (150 reaksiyon)
- RNase / DNase içermeyen su (Sadece iki aşamalı protokol için gerekli)

### 2.3.2. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek reaktifler ve ekipmanları

- Real-Time PCR enstrümanı
- RNA ekstraksiyonu kiti
- PCR inhibitörleri.
- Oasig™ Lyophilised OneStep or Precision™ OneStep 2x qRT-PCR MasterMix tam olarak one step qRT-PCR MasterMix içeriyor
- Pipet ve pipet uçları
- Vorteks ve santrifüj cihazı
- 1.5 ml tüpler

### 2.3.3. Sulandırma Protokolü

1. Her tüp açılmadan önce pulse-spin ve santrifüj işlemlerinden geçirildi
2. Ardından sulandırma işlemi aşağıdaki tabloya göre yapıldı:

**Tablo 1.** Sulandırma İşleminin Bileşenleri ve Hacimleri

Karışım Bileşenleri	Hacim
Pre-PCR paketi	

BNV primer/probe karışımı	165 µl
Internal ekstraksiyon kontrol primer/probe karışımı	165 µl
RT primer karışımı	165 µl
<b>Pre-PCR ısı sızdırmaz folyo</b>	
Internal ekstraksiyon kontrol RNA	600 µl
<b>Post-PCR ısı sızdırmaz folyo</b>	
Positive Control Template *	500 µl

\*Bu bileşen, yüksek kopya içerir ve çok önemli kontaminasyon riski oluşturur. Bu yüzden ayrı bir laboratuvar ortamında açıldı ve ele alındı.

#### 2.3.4. RNA ekstraksiyonu

1. Her örneğe 4µl internal extraction control RNA, RNA lizis/ekstraksiyon tamponunda eklendi.

2. Ardından üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA ekstraksiyonu QIASymphony SP System cihazında yapıldı.

#### 2.3.5. One Step RT-PCR Protokolü

Ters transkripsiyon ve amplifikasyonun bir tek kapalı tüpte bir adımda birleştirilmesi işlemidir. Ancak gerektiğinde bir iki adımda da yapılabilir.

1. Pozitif ve negatif kontroller için yeterli reaksiyonları içeren RNA örneği için aşağıdaki tabloya göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 2.** Reaksiyon Karışımının Bileşenleri ve Hacimleri

Karışım Bileşenleri	Hacim
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x	5 µl
dNTP mix (10 mM each)	1 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µl
WNV primer/probe karışımı	1 µl

Internal ekstraksiyon kontrol primer/probe karışımı	1 µl
RNAse/DNAse içermeyen su	6 µl
<b>Final Hacim</b>	<b>15 µl</b>

2. Real-time PCR yapılacak deney tüplerine (standartlar için) bu karışımlardan 15µl pipetlendi.

3. Deney yapacağımız her kuyucuğa önceden hazırlanan RNA şablonundan 5µl pipetlendi.

4. Negatif kontrol için kullanılan kuyucuğa 5µl RNAse free water pipetlendi.

5. Standart eğriler için seyreltme serisinin hazırlanması:

- RNAse içermeyen sudan 900µl 5 tüp içine pipetlendi ve tüpler 2'den 6'ya kadar numaralandırıldı.
- 2. tüpün içine 100 µl pozitif kontrol şablonu pipetlendi.
- İyice vortekslendi.
- Pipet ucu değiştirildi ve 2. tüpten 3. tüpe 100 µl pipetlendi.
- İyice vortekslendi.
- 4. ve 5. seyreltme serisini tamamlamak için adımlar yinelendi.

**Tablo 3.** Standartlara Göre Kopya Sayısı Hazırlama Çizelgesi

Standart Tüpleri	Kopya Sayısı
Tüp 1 Positive control	$2 \times 10^5$ per µl
Tüp 2	$2 \times 10^4$ per µl
Tüp 3	$2 \times 10^3$ per µl
Tüp 4	$2 \times 10^2$ per µl
Tüp 5	20 per µl
Tüp 6	2 per µl

6.Standart eğri için hazırlanan her bir kuyunun içine standart şablondan 5µl pipetlendi. Her çukurdaki nihai hacim 20 µl oldu.

### 2.3.6. One Step Amplifikasyon Protokolü

**Tablo 4.** Oasig<sup>tm</sup> Onestep 2x RT-Qpcr Mastermix İçin Kullanılan Amplifikasyon Koşulları.

	<b>Adım</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>
<b>50 Siklus</b>	Revers Transkripsiyon	30 dakika	50° C
	Enzim aktivasyonu	15 dakika	95° C
	Denatürasyon	15 saniye	94° C
	Veri Depolama	60 saniye	60° C

\*Fluorojenik veri FAM ve VIC kanallarından bu adım sırasında alındı.

### 2.3.7. Sonuçların yorumlanması

**Tablo 5.** Kontrollere Göre Sonuçların Yorumlanması

<b>Hedeflenen</b>	<b>İnternal Kontrol</b>	<b>Negatif Kontrol</b>	<b>Pozitif Kontrol</b>	<b>Yorum</b>
+	+	-	+	+
+	-	-	+	+
-	+	-	+	-
-	-	-	-	Örnek Yetersiz
+	+	+	+	Örnek Yetersiz

### 2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve hesaplandı. Verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında pearson korelasyon testi kullanıldı.

### 3. BULGULAR

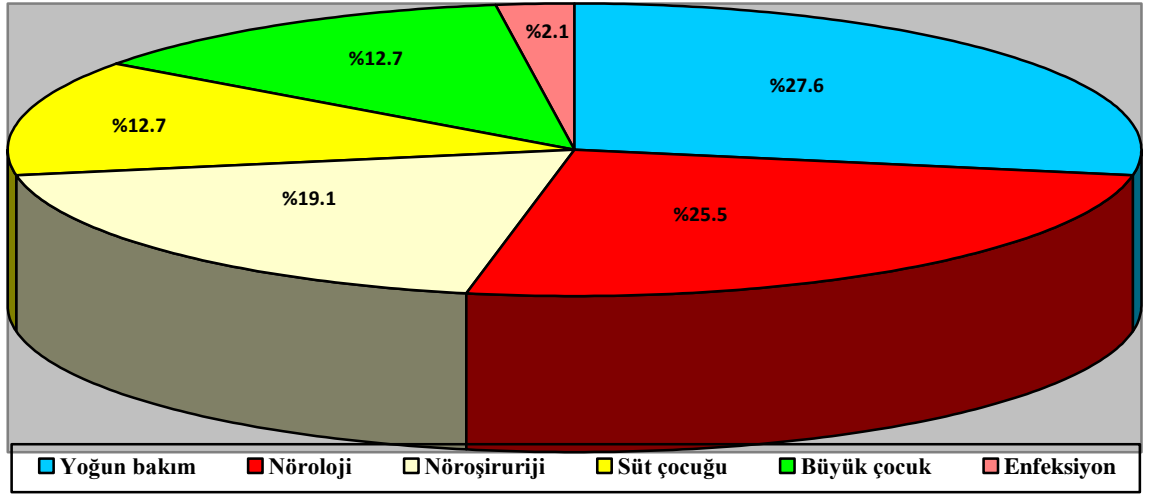
Yaptığımız çalışmada Fırat Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarına rutin olarak gönderilen SSS enfeksiyonu ön tanılı olup, herhangi bir patojen mikroorganizma tespit edilemeyen, 47 adet hastanın 47'si BOS ve 47'si kan (Her hastanın hem BOS hem kan örneği eş zamanlı olarak alındı) olmak üzere toplam 94 numunesi ele alındı.

Hastaların demografik özelliklerine bakıldığında; hastaların 25 (%53,19)'i erkek, 22 (%46,80)'si kadın olup, yaşları 0-72 yıl arasında (yaş ortalaması:19) değişmekteydi. Hastaların yaş aralığı; 0-2 yaş aralığında 6 (%12,76)'sı kadın ve 10 (%21,27)'u erkek olmak üzere toplam 16 (%34,04) hasta mevcut idi. 3-18 yaş aralığında da 4 (%8,51)'ü kadın ve 7 (%14,89)'si erkek olmak üzere toplam 11 (%23,40) hasta mevcut idi. 19-40 yaş aralığında ise 6 (%12,76)'sı kadın ve 7 (%14,89)'si erkek olmak üzere toplam 13 (%27,65) hasta mevcut idi. 41-64 yaş aralığındaki hastaların 4 (%8,51)'ü de kadın idi. 65-72 yaşlar aralığında ise 2 (%4,25)'si kadın ve 1 (%2,12)'i erkek olmak üzere toplam 3 (%6,38) hasta mevcut idi (**Tablo 6**).

**Tablo 6.** Hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılım oranları.

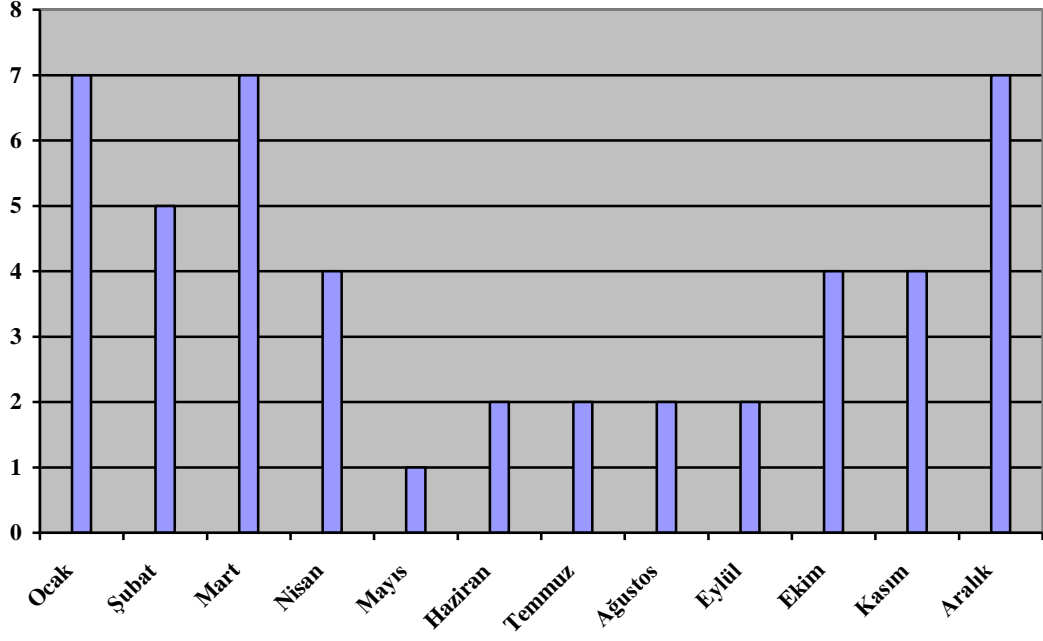
YAŞ VE CİNSİYET	0-2 yaş	3-18 yaş	19-40 yaş	41-64 yaş	65-72 yaş	Toplam
<b>Kadın</b>	6 (%12,76)	4 (%8,51)	6 (%12,76)	4 (%8,51)	2 (%4,25)	22 (%46,80)
<b>Erkek</b>	10 (%21,27)	7 (%14,89)	7 (%14,89)	0 (%0)	1 (%2,12)	25 (%53,19)
<b>Toplam</b>	16 (%34,04)	11 (%23,40)	13 (%27,65)	4 (%8,51)	3 (%6,38)	47 (%100)

Değerlendirmeye aldığımız hastaların tedavi gördüğü klinik servisi dikkate aldığımızda; 13'ü (%27,6) yoğunbakım servislerinde, 12'si (%25,5) nöroloji servisinde, 9'u (%19,1) nöroşiruriji servisinde, 6'sı (%12,7) süt çocuğu servisinde, 6'sı (%12,7) büyük çocuk servisinde, 1'i (%2,1) enfeksiyon hastalıkları servisinde tedavi görmekteydi (**Şekil 11**).



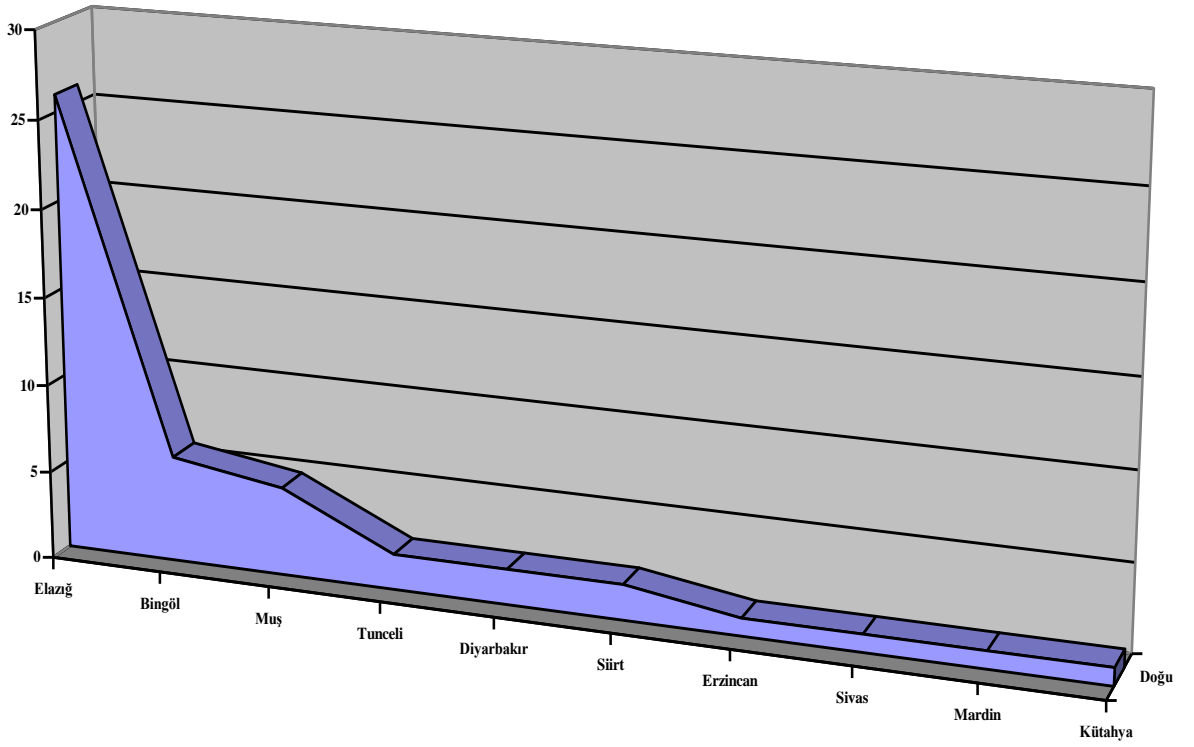
**Şekil 11.** Hasta örneklerinin klinik servislere göre dağılım yüzdesi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yıl içindeki dağılımına baktığımızda kış aylarında ve ilk baharın ilk ayında daha fazla olmak üzere tüm yıl boyunca hastaların dağılımı şekilde görülmektedir (**Şekil 12**).



**Şekil 12.** Hastaların hastaneye yatış tarihlerine göre yıl içindeki dağılımı.

Çalışmaya aldığımız hastaların geldiği il göz önüne alındığında sadece bir hasta bize uzak bir il olan Kütahya'dan hastanemize başvurmuştur. Diğer bütün hastalar hastanemizin de içinde bulunduğu Elazığ başta olmak üzere yakın komşu illerden hastanemize başvurmuştur (**Şekil 13**)



Şekil 13. Hastaların geldiği ile göre dağılımı.

Laboratuvarımıza SSS enfeksiyonu şüphesi ile gönderilen BOS örneklerinin, yaptığımız mikroskopik ve biyokimyasal analizler sonucu BOS hücre sayısı, BOS protein değeri, klor değeri beklenen derecede ılımlı yüksek ve BOS glukoz değeri de ılımlı düşük olup, viral SSS enfeksiyonu ile uyumlu olduğu görülmektedir (Tablo 7).

Tablo 7. BOS Laboratuvar Bulguları.

BOS Bulguları	Değerler	Ortalama	Sınırlar
Hücre sayısı	0-1200/mm <sup>3</sup>	155/mm <sup>3</sup>	-
Glukoz	3-105 mg/dL	53 mg/dL	75-115 mg/dL

<b>Protein</b>	1,3-461 mg/dL	89 mg/dL	15-45 mg/dL
<b>Klor</b>	106-136 mmol/L	122 mmol/L	98-110 mmol/L
<b>Sodyum</b>	138-154 mmol/L	146 mmol/L	135-145 mmol/L
<b>Potasyum</b>	2,4-3,1 meq/L	2,7 meq/L	3,5-5,5 meq/L

Yaptığımız çalışmada toplam 47 BOS örneğinin tamamında BNV IgG antikorları negatif saptandı. Toplam 47 kan örneğinin tamamında da BNV IgG antikorları negatif saptandı. Benzer şekilde 47 BOS örneğinin tamamında BNV IgM antikorları negatif saptandı ve 47 kan örneğinin ise 46'sında BNV IgM antikorları negatif saptandı. Sadece bir kan örneğinde BNV IgM şüpheli pozitif (intemediate) saptanmıştır. BOS örneklerin %100'ü (47/47) BNV IgG antikorları açısından negatif, %97,87 (46/47)'i ise BNV IgM antikorları açısından negatif, % 2,12 (1/47)'si ise BNV IgM antikorları açısından şüpheli pozitif saptanmıştır.

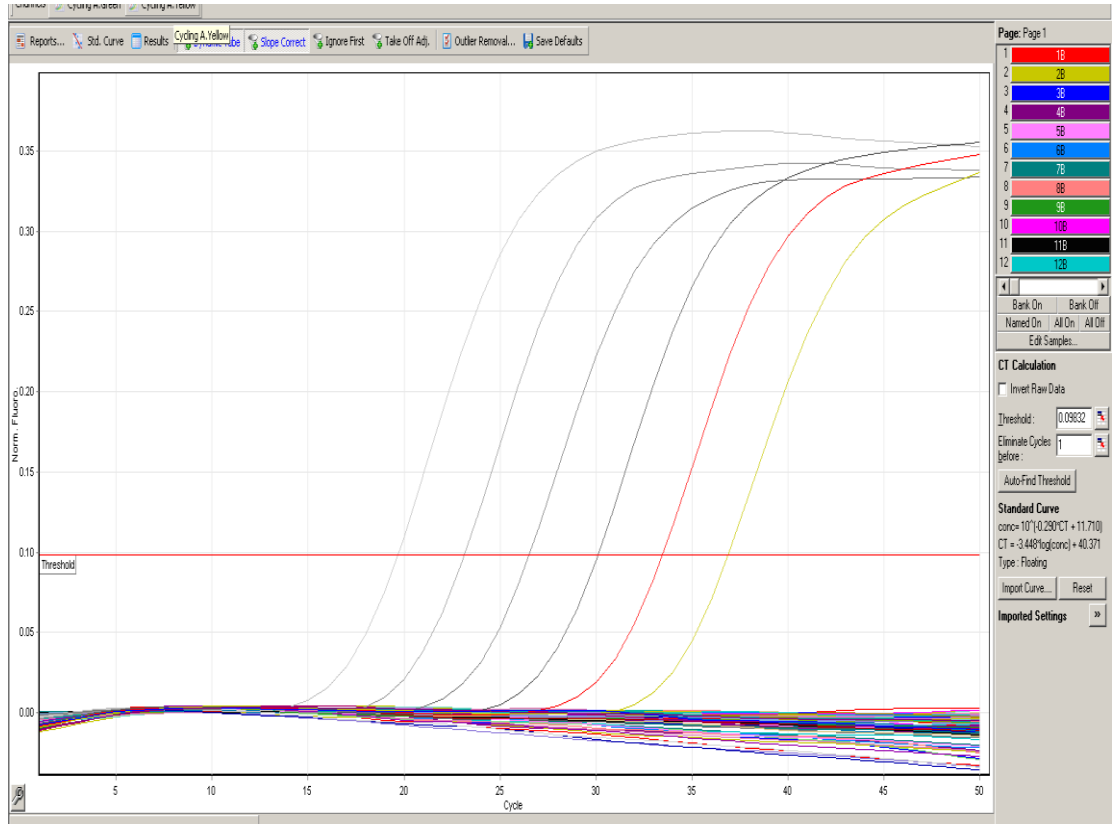
Yapılan pearson korelasyon analizinde BOS IgM ile BOS IgG değeri arasında anlamlı pozitif ilişki ( $p=0,003$ ,  $r=0,430$ ) bulundu. BOS IgM ile KAN IgM arasında anlamlı olmayan negatif korelasyon ( $p=0,420$ ,  $r=0,-121$ ), BOS IgM ile KAN IgG arasında ise anlamlı olmayan pozitif korelasyon ( $p=0,504$ ,  $r=0,100$ ) bulundu (**Tablo 8**).

**Tablo 8.** ELISA sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

<b>Correlations</b>				
	<b>BOS IgM</b>	<b>BOS IgG</b>	<b>KAN IgM</b>	<b>KAN IgG</b>
<b>Pearson Correlation</b>	1	,430**	-,121	,100
<b>BOS IgM Sig. (2-tailed)</b>		,003	,420	,504
<b>N</b>	47	47	47	47
<b>Pearson Correlation</b>	,430**	1	,058	,373**
<b>BOS IgG Sig. (2-tailed)</b>	,003		,697	,010
<b>N</b>	47	47	47	47
<b>Pearson Correlation</b>	-,121	,058	1	,211
<b>KAN IgM Sig. (2-tailed)</b>	,420	,697		,154
<b>N</b>	47	47	47	47
<b>Pearson Correlation</b>	,100	,373**	,211	1
<b>KAN IgG Sig. (2-tailed)</b>	,504	,010	,154	
<b>N</b>	47	47	47	47

\*\* Correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed).

ELISA sonuçlarını moleküler bir yöntem ile karşılaştırmak amacıyla 47 hastanın 47'si BOS ve 47'si kan olmak üzere toplam 94 örneğin tamamında uygulanan gerçek zamanlı (RT) PCR yönteminde, çalışılan örneklerin tamamı viral RNA açısından negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 14)



Şekil 14. Çalışılan örneklerin RT-PCR grafikleri

#### 4. TARTIŞMA

Türkiye, BNV'nin endemik ve epizootik olarak görüldüğü bir coğrafi bölgede bulunmaktadır. Ülkemiz, gerek ekolojik koşulları ve sivrisinek faunası, gerek göçmen kuşların göç yolları üzerinde bulunması bakımından BNV dolaşımına oldukça açık bir coğrafyadadır. Nitekim coğrafi açıdan Türkiye, BNV salgınlarının olduğu ve insan-hayvan BNV olgularının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakın ilişkili bir konumda yer almaktadır (**Şekil 9**). Hem Ortadoğu hem de Avrupa'da benzer iklim şartlarını paylaşan ülkelerde hastalığın görülmesi ve bu ülkeler ile aramızda turizm ve ticari ilişkilerin olması, BNV'nin Türkiye'de mevcudiyeti konusunda kuvvetli şüpheler uyandırmaktadır. Bütün bu özellikleri taşıyan ülkemizde ve özellikle bölgemizde BNV'nin de içinde bulunduğu arboviral hastalıklar ile ilgili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, duyarlılığı ve özgüllüğü daha düşük serolojik yöntemler kullanılmıştır (21,116, 119, 121).

Ülkemizde ilk defa 1964'te insan arbovirüs enfeksiyonlarıyla ilgili, Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden Heperkan ve Arı tarafından yapılan bir çalışmada İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır'dan toplanan 559 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle arbovirüslere karşı oluşan antikorlar araştırılmış ve arbovirüslerle meydana gelen bir hastalığın varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada yaşın ilerlemesiyle seropozitifliğin arttığı da rapor edilmiştir (117).

Ancak ülkemizde BNV varlığını ilk kez 1977 yılında Meço, Güney Doğu Anadolu bölgesinde yaptığı serolojik çalışmada ortaya koymuştur. Meço, 937 serum örneğinde hemaglutinasyon inhibisyon (HI) yöntemiyle BNV seropozitifliği %42.8 gibi oldukça yüksek oranda bulmuştur (119). Serter'in aynı şekilde HI yöntemiyle Ege bölgesinde 1980 yılında yaptığı çalışmada ise, BNV seropozitifliği %29.1 oranında saptanmıştır (121). Ergünay ve arkadaşları 2007 yılında Güney Doğu Anadolu bölgesinde, IFA yöntemiyle %16, PRNT yöntemi ile %9.5 oranında BNV pozitifliği saptamıştır (123).

Ülkemizde klinik BNV varlığı resmi olarak ilk defa T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ağustos 2010 tarihinde yapılmıştır. Manisa ili ve çevresinde 16 olgunun serum ve BOS örnekleri Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü, Viroloji Bölümüne gönderilmiş ve bu olguların üçünde BNV pozitif saptanmıştır (yayınlanmamış veri). Daha sonra Sakarya, İzmir, Aydın ve Isparta'dan toplam dört hastada Batı Nil Ateşi tespit edilmiş. BNV tanısı konulan bu yedi hastanın üçü eksitus olmuştur (21). Manisa ve çevre illerdeki bu olguların, aynı tarihlerde Yunanistan'da ortaya çıkan bir salgının ardından saptanması, vektör ve rezervuar hareketlerinin ülkemizi ciddi anlamda etkilendiğini vurgulamaktadır (111).

Benzer şekilde Ege bölgesinde 2010 yılında, 12'si serolojik olarak doğrulanmış 35 muhtemel BNV enfeksiyözlü olgu bildirilmiştir (155). Bu hastaların 40'ında nöroinvaziv bulgular görülmekle beraber ateş, baş ağrısı, bulantı/kusma, bilinç değişiklikleri sık izlenen belirtiler olmuştur. Bu olguların 15'nide konvülsiyonlar görülmüştür. BOS'un laboratuvar incelemesinin sınırlı sayıdaki hastada yapılabildiği salgında, fokal nörolojik bulgu veya viral RNA pozitifliği konusunda herhangi bir bilgi mevcut değildir (155).

Ankara bölgesinde de 2011 yılında bilinç bulanıklığı, oryantasyon, tremor, karaciğer enzimlerinde yükseklik, BOS'da pleositoz ve protein artışı, serumda ise BNV'ye özgül IgM varlığı ile karakterize bir olgu rapor edilmiş ve hasta yatışının dokuzuncu gününde eksitus olmuştur (156).

Mayıs 2012'de Öcal ve arkadaşları bilinç bulanıklığı, el-kol ve yüzde kas kaspılmaları şikayetleri ile başvuran bir hastanın BOS ve serum örneğinin her ikisinde de BNV RNA'sı PCR yöntemiyle pozitif bulunmuş, virüsün Lineage 1 Clade 1a'ya ait olduğu saptanmıştır. Ayrıca Özkul ve arkadaşlarının 2011'de Eskişehir ve Ankara illerinde insan ve atlarda aynı köken olan "Lineage 1" virüsünü göstermiştir. Bu verilere dayanarak, Orta Anadolu bölgesinde "Lineage 1" virüslerin dolaşımında olduğu söylenmektedir (157).

Ertılav ve arkadaşları ise 2014 yılında böbrek nakli yapılmış bir hastada posttransplantasyonel dönemde meningoensefalit gelişen bir hastanın BOS ve kan örneğini BNV açısından takibe almış, hastanın BOS'unda BNV RNA'sı In-house RT nested PCR yöntemiyle pozitif saptanmıştır. Kan örneği ise aynı yöntemle negatif olarak rapor edilmiştir (158).

Batı Nil Virüsü kaynaklı noroinvazif hastalık, semptomatik enfeksiyonlara nisbeten daha az sıklıkta görülmektedir. BNV sıklıkla menenjit, ensefalit veya poliomyelit benzeri paralizi şeklinde semptom vermektedir (24, 159). Bununla beraber duyu bozuklukları, tremor/parkinsonizm, ataksi, kranial sinir bulguları, optik norit ve poliradikulopati nadiren görülmektedir (24, 160). BNV enfeksiyonların kayıt altına alınması, semptomların daha belirgin olması ve sağlık kuruluşlarına başvurunun daha sık olması durumunda BNV kaynaklı SSS enfeksiyonu olarak rapor edilen olgu sayısı daha fazla olabilmektedir (161). Organ transplantasyonu, ileri yaş ve immunsuprese hastalarda BNV'nin nörolojik hastalık ve mortalite ile ilişkili olabileceğini hatırlatan çalışmalar bulunmaktadır (24, 162, 163).

Ülkemizde MSS tutulumu ile seyreden BNV olguları sınırlıdır. 2009 yılında Ankara bölgesinde BNV ensefaliti 62 yaşındaki bir kadın hastada tespit edilmiştir (164). 2010 yılında da 56 ve 61 yaşlarındaki iki erkek hastada tespit edilmiştir (165). Bu hastalarda yüksek ateş, baş ağrısı, halsizlik, konfüzyon ve bilinç kaybı olmuş, fakat fokal nörolojik bulgu görülmemiştir. BOS'ta lenfositik pleositoz, protein artışı ve özgül IgM antikoru saptanmış; EEG, Bigisayarlı Tomografi (BT) ya da MR incelemelerinde ise herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bu hastalar destekleyici tedavi ile nörolojik sekel olmadan iyileşmiştir (164, 165).

Günümüzde BNV'nin laboratuvar tanısında, sıklıkla spesifik ELISA IgG ve IgM antikoru kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde antijen kaynağı ve test platformuna bağlı olarak duyarlılık ve özgüllük farklılıklar göstermektedir. Zira 2007 yılında Ludolfs ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ELISA sensitivitesi %77.6, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla %93.3 ve %98.8 olarak raporlanmıştır. Benzer şekilde BNV IgM ve IgG antikoru serumda uzun süre kalıcı olabilmesi, akut BNV enfeksiyonun tanısında sıkıntı teşkil etmektedir. Ayrıca enfeksiyonun ilk 5-7 günlerine kadar kanda BNV'ye ait antikoru tespiti mümkün olmamaktadır. Bununla beraber yalancı negatiflikler de olabilmektedir. Bu sebeple, hızlı ve doğru moleküler yöntemler, erken tanı ve epidemiyolojik sürveyans için gerekmektedir. Moleküler yöntemler, spesifik, hassas ve hızlı olduğu için tercih edilebilmektedir (166, 167).

Santral sinir sistemi enfeksiyonları akut seyirlidir. Ciddi oranda ölüm ve kalıcı sekel sebebidir. Bu açıdan, doğru ve hızlı bir şekilde tanıları konulmalıdır. Virüsler ise aseptik menenjitin asıl etkenleridir (168, 169).

Biz çalışmamızda, SSS enfeksiyonu ön tanılı olup herhangi bir patojen mikroorganizma tespit edilemeyen 47 hastanın, Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen rutin BOS ve kan örneklerinde BNV IgG ve IgM antikor varlığının ELISA yöntemi ile araştırılması ve bu örneklerin real-time PCR yöntemi ile karşılaştırılması, bölgemiz ve ülkemiz BNV seroepidemiolojik verilerine katkıda bulunulmasını ümit etmekteyiz.

Bizim çalışmamız, bölgemizde SSS enfeksiyonu ön tanılı hastaların eş zamanlı olarak BOS ve kan örneklerinin her ikisinde de BNV IgG, IgM ve BNV RNA'sının araştırıldığı ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışma BNV'ye bağlı SSS enfeksiyonu için yol gösterici olabilecek ve kliniğimize nedeni bilinmeyen ateş, bilinç değişikliği şikâyetleri ile başvuran fakat tanı koyamadığımız vakaları değerlendirirken BNV'yi ne derecede dikkate almamızı sağlayacaktır.

BNV kaynaklı meningoensefalit olgularının BOS bulguları; pleositoz (ortalama 30-100 hücre/ $\mu$ l, lenfosit baskın), hafif-orta düzeyde protein artışı ve normal glukoz düzeyi olarak belirtilmiştir (15, 127). Bizim çalışmamızın BOS bulguları ise Pleositoz (ortalama 155 hücre), orta derece protein artışı (89 mg/dL) ve hafif glukoz (53 mg/dL) düşüklüğü ile karakterize olup, viral SSS enfeksiyonlarının BOS bulgularıyla uyumaktadır.

Rutin klinik bulgular ve laboratuvar testleri BNV enfeksiyonunun diğer viral etkenlerden ayırıcı tanısında yetersiz kaldığından BNV, özgül virolojik yöntemlere doğrulanmalıdır. Bunun için kan veya BOS'ta BNV'ye özgül antikorların veya viral RNA'nın gösterilmesi şarttır (15, 128, 129). Viremi düzeyi düşük ve kısa süreli olduğu için kandan BNV'nin izolasyonu genellikle başarısız olmaktadır (**Şekil 10**) (14, 15, 18, 24). Buna rağmen nörolojik tutulum için viral yükün yüksek olması, duyarlılıkları düşük de olsa nükleik asit testlerinin önemini artırmıştır (130, 131).

Meço, 1977 yılında Doğu Anadolu bölgesinde 937 serum örneğinde hemagglütinasyon inhibisyon (HI) yöntemiyle BNV seropozitifliği %42.8 gibi oldukça yüksek oranda bulmuştur (119). Ergünay ve arkadaşları da 2007 yılında

Güney Doğu Anadolu bölgesinde, IFA yöntemiyle %16, PRNT yöntemi ile %9.5 oranında BNV pozitifliği saptamıştır (123).

Benzer şekilde biz çalışmamızı, Doğu Anadolu bölgesinin çelitle illerinden hasta kabul eden Fırat Üniversitesi Hastanesinde (Elazığ) yaptık. Bu çalışmamızda 47 hastadan eş zamanlı olarak 47 BOS ve 47 serum örneğini ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile BNV IgG, IgM ve RNA açısından değerlendirmeye aldık. Serum örneklerinin sadece 1 (bir)'inde (%2.12) BNV IgM şüpheli pozitif bulunmuş olup geriye kalan 46 serum örneği BNV IgM açısından negatif bulunmuştur. Ayrıca 47 serum örneğinin tümü BNV IgG ve BNV RNA açısından negatif bulunmuştur.

Petersen ve arkadaşlarının TaqMan yöntemi ile yapmış oldukları bir çalışmada RT-PCR test sonuçları, BOS örneklerinin %55'inde ve serum örneklerinin %10'unda BNV RNA pozitif saptanmıştır. Başka bir çalışmada da PCR sensitivitesi RT-PCR metodunda BOS'ta %57, serumda %14 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmanın sonucuna göre BNV tanısında düşük duyarlılık gösterdiğinden PCR yönteminin serum örneklerinde rutin tanı yöntemi olarak kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir (15, 40).

Bizim çalışmamız da bu çalışmaya benzer fakat farklı olarak bu örneklerden ELISA yöntemiyle BNV IgM ve IgG antikorlarını da araştırdığımız bir çalışma olmuştur. Bizim çalışmamızda, 47 BOS örneğinde BNV IgM seropozitiflik oranı %0 (0/47), 47 kan örneğinde BNV IgM seropozitiflik oranı %0 (0/47), 47 kan örneğinde BNV IgM şüpheli (intermediate) seropozitiflik oranı %2.12 (1/47) olarak tespit edilmiştir. 47 BOS örneğinde BNV IgG seropozitiflik oranı %0 (0/47) ve 47 kan örneğinde BNV IgG seropozitiflik %0 (0/47) olarak saptanmıştır. Aynı örneklerde BNV'yi saptamaya yönelik duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan real-time PCR metodu da bizim çalışmamızda da kullanılmıştır. Benzer şekilde 47 BOS örneğinde RT-PCR ile BNV RNA pozitiflik oranı %0 (0/47), 47 kan örneğinde RT-PCR ile BNV RNA pozitiflik %0 (0/47) olarak saptanmıştır. Yani bütün örnekler RT-PCR ile BNV RNA açısından negatif saptanmıştır.

Viral SSS enfeksiyonlu hastaların BOS analizlerinde bizim çalışmamızla uyumlu olarak hücre artışı, ılımlı düzeyde protein artışı ve ılımlı düzeyde glukoz azalması görülmektedir (169).

Bizim çalışmamıza benzer bir çalışma olarak Ergünay ve arkadaşları, 2010 yılında, Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde aseptik menenjit/ensefalit ön tanısı olan 87 yetişkin hastanın serum ve BOS örneklerinden ELISA ve IFA yöntemleri ile BNV IgM ve IgG antikorlarını araştırmıştır. Bu çalışmada serum örneklerinden 8 (%9.2)'inde IgM, 3 (%3.4)'ünde IgG pozitif olarak raporlanmıştır (96). Ergünay ve arkadaşları bu çalışmada sadece erişkin hastaları dikkate almıştır (96). Biz ise farklı olarak çalışmamıza anneden bebeğe BNV geçişini saptamak amacıyla yenidoğan bebekleri ve çoğu zaman çalışmalara alınmayan çocukları da ilave ettik.

Batı Nil Virüsü enfeksiyonlarından nöroinvaziv hastalığın gelişiminde en önemli risk faktörü ileri yaş olarak tanımlanmıştır (15, 24). BNV'ye bağlı SSS tutulumunun 50 yaş üzerindeki kişilerde riskinin yüksek olması, bu kişilerde kan-beyin engelini bozan hipertansiyon gibi faktörlerin varlığına veya immün sistem fonksiyonlarının azalması nedeniyle viremi süresinin uzamasına bağlanmaktadır (15).

Batı Nil Virüsü ile enfekte olguların ileri yaşta olması (50 ve üzeri yaş) invaziv nörolojik hastalık açısından en anlamlı risk faktörüdür. 1999 yılındaki New York salgınının semptom analizi ile, ciddi nörolojik hastalık insidansının 50-59 yaş arası kişilerde, 0-19 yaş arası kişilerden 10 kat; 80 yaş ve üstü kişilerde ise, 0-19 yaş arası kişilerden 43 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (16).

Türkiye'ye en yakın coğrafya olan Yunanistan'da ise, en yakın tarihli Avrupa'daki BNV salgını 2010 Temmuz-Ağustos ayları arasında bildirilmiştir. Bu salgında nöroinvaziv 81 olgu bildirilmiştir. Özellikle 50 yaş üzerindeki hastalarda ensefalit, menenjit ve meningoensefalit bulgularının görüldüğü bu salgındaki olguların yaş ortalaması 70 olarak rapor edilmiştir (111).

Bu çalışmada, SSS enfeksiyonu ön tanılı olup herhangi bir patojen mikroorganizma tespit edilemeyen hastaların, Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen 47 hastanın BOS ve kan örneklerinde ELISA yöntemi ile BNV IgG ve IgM antikorları negatif olarak saptanmıştır. Sadece bir hastanın kan örneğinde BNV IgM şüpheli pozitif saptanmıştır. Bu şüpheli örneğin BOS'u ve kanı RT-PCR yöntemi ile negatif bulunmuştur. Bu sonuç ELISA yönteminde görülebilen çapraz reaksiyonlara bağlanmıştır. Benzer şekilde tüm örnekler RT-PCR yöntemi ile de çalışılmış BNV'ye ait RNA tespit edilememiştir.

Sonuç olarak; bizim çalışmaya aldığımız hastaların yaş ortalaması 19 olup diğer çalışmalara oranla oldukça düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda BNV seropozitifliği yaş ortalaması ile doğru orantılı olarak artmış bulunmaktadır. Buna binaen bizim çalışmamızda BNV seronegatifliği büyük ölçüde yaş ortalamasının küçük olmasına bağlanmıştır. Ayrıca PCR ve ELISA'yı beraber dikkate aldığımızda çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, bölgemizde BNV sirkülasyonu aktif olmayıp, ekolojik koşulların değişmesi durumunda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olacaktır. Çalışmamızın bu konuda ülkemiz BNV veri tabanına fayda sağlamasını ümit etmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

1. Drew WL. Viral Infection of the Central Nervous System. In: Wilson WR, Sande MA (eds) *Current Diagnosis and Management In Infectious Diseases*. New York: Lange/McGraw-Hill, 2001: 453-462.
2. Gubler DJ. Human arbovirüs infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Dec; 951: 13-24.
3. Cunha BA. West Nile Encephalitis. *Infectious Disease Practice for Clinicians*, 1999; 23(10): 85-89.
4. Briese T, Rambaut A, Pathmajeyen M, Bishara J, Weinberger M, Pitlik S, Lipkin WI. 2002. Phylogenetic analysis of a human isolate from the 2000 Israel West Nile virus epidemic. *Emerg Infect Dis* 8: 528-531.
5. Monini M, Falcone E, Busani L, Romi R, Ruggeri FM. 2010. West Nile virus: Characteristics of an African virus adapting to the third millennium world. *Open Virol J* 22: 42-51.
6. Murray KO, Walker C, Gould E. 2011. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: A decade of advancements in resarch since its introduction into Western Hemisphere. *Epidemiol Infect* 139: 807-817.
7. Ulbert S. 2011. West Nile virus: The complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology* 54: 171-184.
8. Tülek N, Tanyel E. Santral sinir sistemi infeksiyonlarına genel bakıs. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* 3. Baskı, Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1375-1388.

9. Smalling TW, Sefers SE, Li H, Tang YW. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7): 2317-2322.
10. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. Neurotropic virüs isolated from blood of native of Uganda. *Am J Trop Med* 1940; 20: 471-492.
11. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virüs. *Lancet* 2002; 2: 519-529.
12. Reiter P. West Nile virüs in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill* 2010; 15: 19508.
13. Tsai TF. Flavivirüs. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth edition, NewYork: Churchill Livingstone, 2000: 1714-1736.
14. Solomon T, Ooi MH, Beasley DWC, Mallewa M. West Nile encephalitis. *BMJ* 2003; 326: 865-869.
15. Sampathkumar P. West Nile Virüs: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1137-1144.
16. Petersen LR, Marfin AA. West Nile Virüs: a primer for the clinican. *Ann Intern Med* 2002; 137(3): 173-179.
17. Beaty BJ, Calisher CH, and Shope RE. Arbovirüs. In: Lennette EH, Lennette DA, and Lennette ET. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 7th edn. Washington, DC: American Public Health Association; 1995. p. 189–212.

18. Dauphin G, Zientara S. West Nile virüs: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 2007; 25: 5563-5576.
19. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virüs infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344: 1807-1814.
20. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile virüs in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician* 2003; 68: 653-660.
21. 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.
22. Autorino LG, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. 2002. West Nile virüs epidemic in horses, Tuscany Region, Italy. *Emerg Infect Dis* 8: 1372-1378.
23. Radda A. Antibodies Against Group A and B Arbovirüses in Domestic Animals from Turkey. *Ege Üniv Tıp Fak Mecmuası* 1971; 10: 227.
24. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology and clinical manifestations of West Nile Virüs disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1174-1179.
25. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirüs or new lineage of West Nile virüs, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 225-231.
26. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the virüses 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.

27. 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: 618-623.
28. Brault AC. Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet Res* 2009; 40: 43.
29. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus, *Clin Lab Med* 2010; 30(1): 47-65.
30. Gyure KA. West Nile virus infections *J Neuropathol Exo Neurol* 2009; 68(10): 1053-1060.
31. Botha EM, et al. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 222-230.
32. Nurray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 2010; 41(6): 67.
33. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus; from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and The Americas. *J Virol* 2011; 85(6): 2964-2974.
34. 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.
35. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science* 2003; 302: 248.

36. Brinton MA. The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 371-402.
37. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol* 2007; 6: 171-181.
38. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res* 2009; 81: 6-15.
39. Sanchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 2005; 336(1):70-82
40. Petersen LR, Roehrig JT. West Nile Virus: a reemerging global pathogen. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 611-614.
41. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *Journal of virology* 2000; 74(7): 3253-3263.
42. 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: 19111-19116.
43. 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: 9349-9360.
44. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin mediated endocytic pathway. *J Virol* 2004; 78: 10543-10555.

45. Davis CW, Nguyen HY, Hana SL, Sanchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virüs discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol* 2006; 80: 1290-1301.
46. Chu JJ, Choo BG, Lee JW, Ng ML. Actin filaments participate in West Nile (Sarafend) virüs maturation process. *J Med Virol* 2003; 71: 463-472.
47. Holmes DA, Purdy DE, Chao DY, Noga AJ, Chang GJ. Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virüs-like particles or virüs-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3227-3236.
48. 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 virüs E protein protects from lethal infection in mice. *Virol J* 2010; 7: 146.
49. Chu JJH, Ng ML. The mechanism of cell death during West Nile virüs infection is dependent on initial infectious dose. *J Gen Virol* 2003; 84: 3305-3314.
50. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 343-355.
51. Hartemink NA, Davis SA, Reiter P. ve ark. (2007) Importance of bird-to-bird transmission for the establishment of West Nile virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7: 575-584.
52. Granwehr BP, Lillibridge KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA, et al. West Nile virus: where are we now? *The Lancet infectious diseases* 2004; 4(9): 547-556.

53. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virüs: 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: 147-156.
54. Özer N. Batı Nil Virüsü ve Vektörleri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2006; 40 121-128.
55. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging infectious diseases* 1999; 5(5): 643-650.
56. 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: 392-397.
57. 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: 127-142.
58. Trock ES, Meade JB, Glaser LA, et al. West Nile Virüs outbreak among horses in New York State 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 745-749.
59. 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: 692-696.
60. Yazıcı Z. Batı Nil Virusunu infeksiyonu. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2005; 19 (1): 139-143.
61. Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flavivirüs. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 196-206

62. Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE, West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses* 2011; 3(6): 811-828.
63. Castillo-Olivares J, Wood J, West Nile virus infection of horses. *Wet Res* 2004; 35(4): 467-483.
64. Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev* 2008; 225: 212-225.
65. 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: 1366-1373.
66. 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: 3059-3066.
67. 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: 2578-2586.
68. Diamond MS. Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog* 2009; 5: 1000452.
69. 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: 7737-7747.

70. Samuel MA, Diamond MS. Type I IFN protects against lethal West Nile Virüs infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol* 2005; 79: 13350-13361.
71. Gilfoy FD, Mason PW. West Nile virüs-induced IFN production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol* 2007; 81: 11148-11158.
72. 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 virüs replication fitness and virulence. *J Virol* 2006; 80: 9424-9434.
73. 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 virüs infection. *J Virol* 2006; 80: 5338-5348.
74. Diamond MS, Sitati E, Friend L, Shrestha B, Higgs S, Engle M. Induced IgM protects against lethal West Nile virüs infection. *J Exp Med* 2003; 198: 1-11.
75. 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 virüs infection. *J Virol* 2005; 79: 7466-7477.
76. Sitati E, Diamond MS. CD4+ T cell responses are required for clearance of West Nile virüs from the central nervous system. *J Virol* 2006; 80: 12060-12069.
77. Shrestha B, Diamond MS. The role of CD8+ T cells in the control of West Nile virüs infection. *J Virol* 2004; 78: 8312-8321.

78. 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: 880-888.
79. Guo JT, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha-interferon. *J Virol* 2005; 79: 1343-1350.
80. Evans JD, Seeger C. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signalling. *J Virol* 2007; 81: 11809-11816.
81. 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: 1934-1942.
82. Hollinger FB, Kleinman S. Transfusion transmission of West Nile virus: a merging of historical and contemporary perspectives. *Transfusion* 2003; 43(8): 992-997.
83. Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion* 2002; 42(8): 1019-1026.
84. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *The New England journal of medicine* 2003; 349(13): 1236-1245.
85. Gould LH, Fikrig E. West Nile virus: a growing concern? *The Journal of clinical investigation* 2004; 113(8): 1102-1107.

86. Centers for Disease Control and Prevention. Detection of West Nile virus in blood donations--United States, 2003. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2003; 52(32): 769-772.
87. 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.
88. 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: 2196-2203.
89. 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(39): 877-878.
90. Centers for Disease Control and Prevention. Intrauterine West Nile virus infection-New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 1130-1136.
91. 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: 788-793.
92. Giladi M, Metzker-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: 659-661.
93. 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: 654-659.

94. Emig M, Apple DJ. Severe West Nile virüs disease in healthy adults. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 289-292.
95. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virüs activity-United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57: 720-723.
96. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Şener B, Lederer S, Steinhagen K, et al. Ankara Bölgesinde Nedeni Bilinmeyen Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Batı Nil Virüsünün Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010; 44: 255-262.
97. Azap A, Meço O. Batı Nil virusu ensefaliti. *Klinik Gelişim Dergisi* 2010; 23(3): 51-55.
98. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases* 2005; 11(8): 1167-1173.
99. Diamond MS. West Nile Encephalitis Virus İnfection: Viral Pathogenesis and the Host Immun Response. 1st ed. Sprindler: Nev York-USA, 2009.
100. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 2010; 41(6): 67.
101. Gould EA, Higgs S, Buckley A, ve ark. (2006). Potential Arbovirus Emergence and Implications for the United Kingdom, *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 549-555.
102. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I. (1976). Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*, 72: 295–300.

103. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann NY Acad Sci* 2001; 951: 117-126.
104. 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: 487-490.
105. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virüs in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 306-309.
106. Soliman A, Mohareb E, Salman D, Saad M, Salama S, Fayez C, et al. Studies on West Nile virüs infection in Egypt. *J Infect Public Health* 2010; 3: 54-59.
107. Ceianu CS, Ungureanu A, Nicolescu G, et al. West nile virüs surveillance in Romania: 1997-2000. *Viral Immunol* 2001; 14: 251-262.
108. Platonov AE. West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951: 102-116.
109. 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: 45-53.
110. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnár Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V, Kaszas K. West Nile virüs infections in Hungary, August-September 2008. *Euro Surveill* 2008; 13: 19030.
111. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of West Nile virüs infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill* 2010; 15: 19644.

112. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K. Origin of the West Nile virüs responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286: 2333-2337.
113. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virüs in Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 319-328.
114. Garmendia AE, Van Kruiningen HJ, French RA. The West Nile virüs: its recent emergence in North America. *Microbes Infect* 2001; 3: 223-229.
115. 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: 1162-1166.
116. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(6): 731-741.
117. Heperkan Y, Arı A. Türkiye’de ARBOR virusları üzerinde bir çalışma. *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi* 1964; 24: 113-117.
118. Tosun S. Batı Nil virüs enfeksiyonu. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 29: 183-192.
119. Meço O. West Nile arbovirüs antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of southeast Anatolia. *Mikrobiyol Bul* 1977; 11: 3-17.
120. Allwinn R, Doerr HW, Emmerich P, Schmitz H, Preiser W. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Medical microbiology and immunology* 2002; 190(4): 199-202.

121. Serter D. Present status of arbovirus sero -epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1980(9): 155-161.
122. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virüs (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 826-829.
123. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S. Seroprevalence of West Nile virüs and tick-borne encephalitis virüs in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virüs infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 157-161.
124. Hızel K, Yenicesu İ, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan I, Kalkancı A, Dilsiz G. Sağlıklı kan vericilerinde Batı Nil virüsünün araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 425-430.
125. Ergunay K, Saygan MB, Aydoğan S, Menemenlioglu D, Turan HM, Ozkul A, Us D. West Nile virüs seroprevalence in blood donors from central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 771-775.
126. Kalaycıoğlu H. Türkiye’de görülen West Nile vakalarının epidemiyolojisi. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu 2010: 174-183.
127. Centers for Disease Control and Prevention. Information and guidance for clinicians: West Nile virüs: clinical description 2004. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/clinicians/clindesc.htm>
128. 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: 544-549.

129. 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: 146-154.
130. The New York State Department of Health. Guidelines and recommendations for health care providers. 2003. [www.nyc.gov/html/doh/html/wnv/wnvhcp.shtml](http://www.nyc.gov/html/doh/html/wnv/wnvhcp.shtml)
131. 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](http://www.cdc.org/ncidod/dubid/westnile/lab_guidance.htm)
132. Ergünay K, editor. Batı Nil Virusu: Viroloji, Epidemiyoloji ve Mikrobiyolojik Tanı. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu; 2010; Ankara.
133. Özkan D. İstanbul'da Batı Nil Virusu Taraması. Yüksek Lisans Tezi 2006.
134. Serter D. Arbovirüs enfeksiyonlarında tanı ilkeleri. XIII Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 2007: 106-108.
135. 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: 1823-1826.
136. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, et al. Persistence of virüs-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virüs encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 376-379.

137. Kapoor H, Signs K, Somsel P, Downes FP, Clark PA, Massey JP. Persistence of West Nile virüs (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J Clin Virol* 2004; 31: 289-291.
138. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virüs and antibody dynamics in acute West Nile virüs infection. *J Infect Dis* 2008; 198: 984-993.
139. 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 virüs and St. Louis encephalitis virüs infections during the 2002 West Nile virüs epidemic in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 1130-1133.
140. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsay MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virüs from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4066-4071.
141. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virüs. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 257-263.
142. Marfin AA, Gubler DJ. West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clinical infectious diseases:an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001; 33(10): 1713-1719.
143. Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. Ribavirin inhibits West Nile virüs replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* 2000; 182: 1214-1217.

144. Anderson JF, Rahal JJ. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virüs in vitro. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 107-108.
145. Chan-Tack KM, Forrest G. Failure of interferon alpha-2b in a patient with West Nile virüs meningoencephalitis and acute flaccid paralysis *Scand J Infect Dis.* 2005; 37: 944-946.
146. Lewis M, Amsden JR. Successful treatment of West Nile virüs infection after approximately 3 weeks into the disease course. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 455-458.
147. Shimoni Z, Niven MJ, Pitlick S, Bulvik S. Treatment of West Nile virüs encephalitis with intravenous immunoglobulin [letter]. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 759.
148. 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 virüs encephalitis. *Transpl Infect Dis* 2002; 4: 160-162.
149. Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinzon S, Segal S, Rager-Zisman B. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virüs infection in mice. *J Infect Dis* 2003; 188: 5-12.
150. Kılıç A, Doğancı L. Batı Nil Virus. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2003; 33: 284-290.
151. Ertürk A. Batı Nil Virüsü enfeksiyonunda korunma ve kontrol. III Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu 2010:166-173.
152. Hall RA, Khromykh AA. West Nile virüs vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1295-1305.

153. Monath TP, Liu J, Kanesa-Thanan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, et al. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6694-6699.
154. 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: 190-195.
155. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012; 17(21): 20182.
156. Yeşilkaya A, Kurt Azap O, Arslan H ve ark. Ölümcül seyreden Batı Nil virusu ensefaliti olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 488-492.
157. Öcal M, Önder H, Arsava EM. Ankara ilinde Batı Nil Virusü Köken-1 Kaynaklı bir Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonu Olgusu. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2013; 47((1): 164-172.
158. Ertılav M, Özkul A, Zeytinoglu A, Şen S, Sipahi S, Töz H, Kitiş Ö, Eraslan C. Böbrek Nakli Alıcısında Batı Nil Virusuna Bağlı Meningoensefalit *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 674-682.
159. Watson JT, Pertel PE, Jones RC, et al. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* 2004; 141: 360-365.
160. Jeha LE, Sila CA, Lederman RJ, et al. West Nile virus infection: a new acute paralytic illness. *Neurology* 2003; 61: 55-9. Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* 2003; 290: 511-515.

161. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 2001; 358: 261-264.
162. Han LL, Popovici F, Alexander JP Jr, et al. Risk factors for West Nile virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *J Infect Dis* 1999; 179: 230-233.
163. Ravindra KV, Freifeld AG, Kalil AC, et al. West Nile virus associated encephalitis on recipients of renal and pancreas transplants: case series and literature review. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1257-1260.
164. Ergünay K, Özkul A. Ankara bölgesinde nedeni bilinmeyen santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan Batı Nil virusu seropozitifliğinin doğrulanması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 381-383.
165. Ergunay K, Sayiner A, Litzba N, et al. Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey. *J Infect* 2012; 65(4): 343-349.
166. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology journal* 2013; 10: 58.
167. Ludolfs D, Niedrig M, Paweska JT, Schmitz H. Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2007; 26(7): 467-473.
168. Tunkell AR, Scheld WM. Acute meningitis. In: Mandell LG, Bennet JE, Dolin R, (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005; 1083-1120.

169. Rotbart HA. Viral meningitis. *Semin Neurol* 2000; 20(3): 277-292.

## ÖZGEÇMİŞ

1 Mayıs 1988 tarihinde, Elazığ'ın Arıcak ilçesinde dünyaya geldim. İlkokulu Elazığ'ın Arıcak ilçesi Saman Mahallesi İlkokulu'nda, ortaokulu Arıcak Yatılı İlköğretim Bölge Okulu (YİBO)'unda okudum. Lise eğitimimi 2002-2005 yıllarında Elazığ Hıdır Sever Lisesi'nde tamamladım. 2005'te Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Tıp eğitimime başladım. 2011 yılında mezun oldum. Aynı yıl Aralık ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ihtisas eğitimime başladım. Evliyim henüz çocuğum yok.