

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

**NEDENİ BİLİNMEYEN ATEŞ VE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ
ENFEKSİYONU OLGULARINDA FLAVİ VE
FLEBOVİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Murat ÖCAL

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2015

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

**NEDENİ BİLİNMEYEN ATEŞ VE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ
ENFEKSİYONU OLGULARINDA FLAVİ VE
FLEBOVİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Murat ÖCAL

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Koray ERGÜNAY**

**ANKARA
2015**

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasındaki bütün aőamalara olan katkı ve emeklerinin yanı sıra eğitimim boyunca bana olan desteği ve aktarmıő olduğu tecrübeleri nedeniyle tez danıőmanım Doç. Dr. Koray Ergünay'a,

Biz asistanlarının arkasında olduğunu zaman zaman dile getiren ama her zaman hissettiren Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu'ya,

Eğitimim boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen, yapıcı eleőtirileri ve bana vermiş olduğu güven nedeniyle Prof. Dr. Dürdal Us'a,

Hocam olmasının yanında, her zaman sıcak ve samimi tavırlarıyla bir arkadaş olan, emeğini ve desteğini her an hissettiğim, kendisi ile çalıőmıő olmaktan dolayı mutluluk duyduğum Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'a,

Gerek eğitimim süresince olan emekleri, gerek "Büyük Sınav"a hazırlanırken olan destekleri ile tansiyonumu düşürebilen hocam Prof. Dr. Ahmet Pınar'a,

Çalıőmamın her aőamasında katkısı bulunan, kendisi ile tanışmıő olduğum için kendimi őanslı hissettiğim İrfan Atmaca'ya,

Gri Ankara'da bana farklı renklerin de var olduğunu gösteren, her zaman yanımda olan ve olacak olan çok sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Özlem Doğan ve M.Sc. Serra Örsten'e,

Eğitimimde bilgileriyle bana katkıda bulunan değerli hocalarıma,

Uzun yıllar kendilerinden uzakta olsam da bana her an yanımda olduklarını hissettiren ve destek olan annem ve babama teşekkür ederim.

ÖZET

ÖCAL, M. Nedeni Bilinmeyen Ateş ve Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonu Olgularında Flavi ve Flebovirusların Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi. Ankara, 2015.

Batı Nil virusu (BNV), kene-kaynaklı ensefalit virusu (KKEV) ve Toskana virus (TOSV), önemli vektör kaynaklı ateşli hastalık ve menenjit/ensefalit etkenleridir. Bu çalışmada, önceki raporlara göre virus aktivitesinin gösterildiği bir bölgedeki üçüncü basamak sağlık kuruluşu ve referans merkezinde, ilgili virusların etken olarak varlığı ve önemi araştırılmıştır. Toplam 94 hastadan alınan serum ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri incelenmiş, örneklerde viral nükleik asit özgül ve jenerik PCR ile, antikor yanıtı ise ticari indirekt immünofloresan testleri (IIFT) ile araştırılmıştır. Toplam 8 olguda (8.5%) BNV veya TOSV enfeksiyonları saptanmış, 7 olguda (%7.4) ise, daha önce gerçekleşmiş BNV veya TOSV maruziyeti gösterilmiştir. İki olguda viral RNA tayini ile nöroinvazif BNV enfeksiyonu tespit edilmiş, PCR ürünlerinin dizi analizi sonucunda, enfeksiyon oluşturan viruslar BNV "köken 1 grup 1a" olarak tanımlanmıştır. Toplam 12 olguda (%12.7) KKEV IgG ve/veya IgM antikorları saptanmış ancak ek olarak uygulanan plak redüksiyon nötralizasyon testi'de (PRNT) özgüllük doğrulanamamıştır. Toplam 2 olguda doğrulanmış, 4 olguda ise muhtemel TOSV enfeksiyonları saptanmıştır (6.4%). TOSV RNA'sı saptanan olguda dizi analizi sonucunda enfeksiyon oluşturan virus "TOSV genotip A" olarak tanımlanmıştır. Viral RNA saptanan olguda klinik izlem sırasında geçici pansitopeni ortaya çıkmış; bu durum TOSV enfeksiyonlarında ilk kez rapor edilmiştir. Sonuç olarak bölgemizde süregelen BNV ve TOSV aktivitesi doğrulanmış, ilgili etkenlerle enfeksiyonların diğer bölgelerimizde de izlendiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. TOSV ve BNV, nedeni bilinmeyen ateşli hastalık, menenjit ve ensefalit durumlarında etken olarak değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Batı Nil Virus, BNV, kene-kaynaklı ensefalit virusu, KKEV, Toskana Virus, TOSV, menenjit, ensefalit

ABSTRACT

OCAL, M. Investigation of Flavi and Phleboviruses in Febrile Diseases and Central Nervous System Infections of Unknown Etiology. West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Toscana virus (TOSV) are among frequently-observed vector-borne viruses causing febrile disease and/or meningitis/encephalitis. The impact of these viruses were investigated at a referral center in Ankara province, Central Anatolia in 2012, where previous reports suggested virus circulation. Serum and/or cerebrospinal fluid samples from 94 individuals were evaluated. Viral nucleic acids in clinical samples were sought via specific and generic PCRs and antibody responses in clinical samples were investigated via commercial indirect immunofluorescence tests (IIFTs). In 8 (8.5%) patients, infections of WNV or TOSV were identified, where previous exposure to these viruses have been revealed in 7 (%7.4) individuals. In 2 patients, neuroinvasive WNV infections were diagnosed via viral nucleic acid detection, where the virus strains were characterized as lineage 1 clade 1a via sequencing of the amplicons. TBEV IgG and/or IgM antibodies were detected in 12 cases (12.7%) but antibody specificity could not be confirmed via plaque reduction neutralization test (PRNT). Confirmed and probable TOSV infections were identified in 2 and 4 cases (6.4%), respectively. In one case with detectable TOSV RNA, the infecting isolate was characterized as TOSV genotype A via sequencing of amplicons. A transient pancytopenia was noted in this patient, which is reported for the first time in TOSV infections. In conclusion, circulation of BNV and TOSV was confirmed in our region, with further data indicating virus activity in other regions as well. These viruses must be considered in cases of fever, meningitis and encephalitis of unknown etiology.

Key words: West Nile Virus, WNV, Tick-borne encephalitis virus, TBEV, Toscana Virus, TOSV, meningitis, encephalitis

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Batı Nil Virusu	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon	6
2.1.4. Yaşam Döngüsü	7
2.1.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	8
2.1.6. Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	11
2.1.7. Türkiye'deki Durum	13
2.2. Kene Kaynaklı Ensefalit Virusu	14
2.2.1. Tarihçe	14
2.2.2. Sınıflandırma	16
2.2.3. Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon	17
2.2.4. Yaşam Döngüsü	18
2.2.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	19
2.2.6. Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	21
2.2.7. Türkiye'deki Durum	23

2.3. Toskana Virus ve Diğer Fleboviruslar	24
2.3.1. Tarihçe	24
2.3.2. Sınıflandırma	25
2.3.3. Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon	26
2.3.4. Yaşam Döngüsü	27
2.3.5. Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı	29
2.3.6. Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	31
2.3.7. Türkiye'deki Durum	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. İncelenen Olgular ve Örnekler	35
3.2. Klinik Örneklerin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	35
3.3. RNA Saflaştırılması	35
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	36
3.5. Klinik Örneklerde BNV Araştırılması	37
3.5.1. BNV RNA'sının Saptanması	37
3.5.2. BNV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması	39
3.6. Klinik Örneklerde KKEV Araştırılması	42
3.6.1. KKEV Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Saptanması	42
3.6.2. KKEV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması	45
3.7. Klinik Örneklerde TOSV Araştırılması	46
3.7.1. TOSV RNA'sının Saptanması	46
3.7.2. TOSV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması	49
3.8. BNV ve TOSV Kısmi Dizilerinin Tanımlanması	51
4. BULGULAR	52
4.1. Çalışma Grubunda BNV Enfeksiyonları	52
4.1.1. BNV Nükleik Asit Saptanması Sonuçları	52
4.1.2. BNV Antikor Sonuçları	56

4.2. Çalışma Grubunda KKEV Enfeksiyonları	56
4.2.1. KKEV Antikor Sonuçları	56
4.3. Çalışma Grubunda Flebovirus-TOSV Enfeksiyonları	57
4.3.1. Flebovirus-TOSV Nükleik Asit Sonuçları	57
4.3.2. TOSV Antikor Sonuçları	60
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇLAR	71
7. KAYNAKÇA	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BNV	Batı Nil virusu
cDNA	Complementary DNA
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Deoksiribonükleik asit
EEG	Elektroensefalografi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HI	Hemaglütinasyon inhibisyon
IIFT	Indirect immunofluorescence test
JEV	Japon ensefaliti virusu
KKE	Kene kaynaklı ensefalit
KKEV	Kene kaynaklı ensefalit virusu
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
PLED	Paroksizmal lateralize epileptiform desarj
PRNT	Plak redüksiyon nötralizasyon testi
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SFNV	Sandfly fever Naples virus
SFSV	Sandfly fever Sicilian virus
TOSV	Toskana virus
VNT	Virus nötralizasyon testi

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 2.1. BNV'nin Genomik Yapısı ve Proteinleri	6
Şekil 2.2. BNV'nin Doğadaki Yaşam Döngüsü	8
Şekil 2.3. Kene Kaynaklı Flavivirusların Filogenetik Analizi	16
Şekil 2.4. KKE'nin Coğrafik Dağılımı	21
Şekil 2.5. Flebovirus Partikülünün Şematik Yapısı	27
Şekil 2.6. TOSV'nin Doğadaki Yaşam Döngüsü	28
Şekil 3.1. IIFT Yönteminin Uygulanması	41
Şekil 3.2. ELISA Yönteminin Uygulanması	44
Şekil 4.1. 1 Numaralı BNV Olgusunda, Serum ve BOS Örneklerinde Saptanan Kısmi BNV Dizilerinin Analizi.	54
Şekil 4.2. 2 Numaralı BNV Olgusunda Serum Örneğinde Saptanan Kısmi BNV Dizilerinin Analizi.	55
Şekil 4.3. 1 Numaralı TOSV Olgusunda Serum Örneğinde Saptanan Kısmi TOSV Dizilerinin Analizi	59
Şekil 4.4. TOSV Antikorları Pozitif Örneklerin Floresan Mikroskopunda Görünümü	60

TABLULAR

	SAYFA
Tablo 2.1. Avrupa Birliği ve Bazı Komşu Ülkelerde 1990-2010 Yılları Arası Saptanan BNV Aktivitesi	13
Tablo 3.1. İki Turlu BNV PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Viral Genomdaki Yerleşimleri	37
Tablo 3.2. BNV PCR için Karışım İçeriği ve Reaksiyon Koşulları	38
Tablo 3.3. Pan-Flebovirus PCR Karışım İçeriği ve Reaksiyonu Koşulları	47
Tablo 3.4. Pan-Flebovirus PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Viral Genomdaki Yerleşimleri	48
Tablo 4.1. BNV Enfeksiyonu Saptanan Olguların Özellikleri	53
Tablo 4.2. İncelenen Olgularda BNV Serolojik Test Sonuçları	56
Tablo 4.3. İncelenen Olgularda KKEV Serolojik Test Sonuçları	57
Tablo 4.4. TOSV Enfeksiyonu Saptanan Olguların Özellikleri	58
Tablo 4.5. İncelenen Olgularda TOSV Serolojik Test Sonuçları	60

1. GİRİŞ

Sivrisinek, tatarcık ve kene gibi kan emen artropodlar aracılığıyla duyarlı omurgalı konaklar arasında taşınan viruslar arboviruslar olarak adlandırılır (1). Arboviruslar, endemik bölgelerde yaşayan yerli nüfus ve ziyaret edenlerde ateşli hastalık ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. İnsan patojeni olan arbovirusların büyük kısmı; *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae* ve *Reoviridae* ailelerinde sınıflandırılmaktadır. Vektörlerin görüldüğü Batı Asya, Avrupa ve Akdeniz havzasında, ateşli hastalık ve merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu yapan arboviruslar arasında Batı Nil virusu (BNV), Toskana virus (TOSV) ve kene-kaynaklı ensefalit virusu (KKEV) önemli yer tutmaktadır (2, 3).

Bu virusların aktiviteleri ülkemizde saptanmış ve ilk olgular 2009-2010 yıllarında rapor edilmiştir. Ancak olguların ayrıntılı olarak incelendiği prospektif klinik çalışmalar bulunmamaktadır (4). Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde saptanan nedeni bilinmeyen ateş ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında BNV, KKEV, TOSV ve diğer fleboviruslar araştırılmıştır. Çalışmada ilgili virüslere ait IgM ve IgG sınıfı antikorların saptanmasında standardize yöntemler kullanılmış, BNV ve flebovirus RNA'ları ise "nested PCR" yöntemiyle araştırılmıştır. Viral etiyoloji saptanan olguların klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirilmiş, RNA saptanan olgularda ise filogenetik analizlerle saptanan izolatların Türkiye ve diğer endemik bölgelerde görülen virüslerle benzerlikleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Batı Nil Virusu

2.1.1 Tarihçe

Batı Nil Virusu (BNV) ilk olarak 1937 yılında Afrika kıtasında, günümüz Uganda'sında yer alan Batı Nil bölgesinde ateşli, hafif bir hastalık geçiren bir kadından izole edilmiştir (B 956 suşu)(5). 1950'li yılların başlarında Batı Nil ateşinin etiyolojik ajanı olarak kabul edilmiştir ve Kuzey Afrika ve Orta Asya'da ateşli çocuklardan zaman zaman izole edilmiştir (6).

Virus ilk tanımlamanın ardından rezervuarı olan göçmen kuşlarla Avrupa'nın güney bölgeleri, Asya ve Avustralya'ya yayılmıştır (7). 1950'lere kadar insanlarda ve atlarda sinir sistemi tutulumu olan vakalar bildirilmiştir (8). BNV 1950'lerde Akdeniz bölgesinde epidemilere neden olmuş ve virusun epidemiyolojisi ve ekolojisi ilk olarak bu epidemilerde detaylı olarak tanımlanmıştır (6). Tanımlanan ilk epidemi 1951 yılında, İsrail'de Haifa yakınlarındaki Maayan Zvi yerleşkesinde ortaya çıkmıştır (9). Epidemi Temmuz ayı sonundan Ekim ayına kadar sürmüş ve epidemi boyunca virusun neden olduğu klinik bulgular detaylı olarak tanımlanmış, ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, iştahsızlık, karın ağrısı, ciltte döküntüler ve kusma başlıca semptomlar olarak kaydedilmiş, daha nadiren lenfadenopati, boğaz ağrısı ve ishale neden olduğu belirlenmiştir. Mısır'da 1951-1954 yılları arasında görülen epidemiler BNV'nin ekoloji, epidemiyoloji ve klinik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (10). 1951 yılında yukarı Nil Deltasında BNV'nin insan ve hayvanlarda serosürveyansı, vektör izolasyonu ve tanımlanması, kuşlar, atlar, artropodlar ve insanlarda deneysel enfeksiyonlar ve ekolojik değerlendirmeleri içeren kapsamlı bir BNV araştırması başlatılmıştır (10). Araştırmalar sonrasında Nil nehri boyunca BNV seroprevalansının %60'lara ulaştığı ve bölgenin endemik olduğu, virusun küçük çocuklarda daha sık semptom verdiğini ve sıklıkla kendini sınırlayan, ateşli hastalığa neden olduğu görülmüştür. Serosürveyans çalışmaları sonucunda BNV'nin bir çok kuş ve memeli türü için enfeksiyöz

olduğu, atlarda semptomatik seyir gözleendiği ve sıklıkla fatal seyrettiği görülmüş ve BNV nötralizan antikörlerin özellikle kuşlarda yaygın olduğu gösterilmiştir.

Nörolojik tutulum deneysel enfeksiyonlar sonucu nadiren görülürken, 1957 yılında İsrail'deki bir epidemide huzurevinde yaşıyan yaşlı insanlarda ciddi nörolojik tutulumu olan vakalar bildirilmiştir (11). Ancak daha sonrasında, 1962 yılında Fransa ve 1974 yılında Güney Afrika'da görülen epidemilerde menenjit ve ensefalit vakaları bildirilmiştir (12, 13). Zaman zaman Rusya, İspanya ve Hindistan'da benzer epidemiler bildirilse de 1980'lerin sonunda dek büyük epidemiler görülmemiştir (14). 1990'ların ortasına kadar BNV sporadik vakalar ile ilişkilendirilmiş ancak Cezayir (1994), Romanya (1996), Tunus (1997), İtalya (1998) Rusya (1999)'dan nörolojik tutulumun öne çıktığı epidemiler rapor edilmiştir (14, 15).

1999 yılına kadar Eski Dünya ile sınırlı kalan BNV Ağustos 1999'ta Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin New York şehrinde başlayan ensefalit salgınında izole edilmiş ve virus Yeni Dünya ile tanışmıştır. Salgının öncesinde ve salgın sırasında kuşlarda yüksek fatalite oranları ile seyreden salgın hastalık dikkati çekmiştir (16). Kuzey Amerika'da BNV'nin New York 1999 (NY99) suşu ilk defa Amerikan kargasından izole edilmiş ve hemen ardından 1999 Ağustos-Kasım ayları arasında toplanan diğer kuş türlerinin karkaslarından da izole edildiği bildirilmiştir. Eş zamanlı olarak BNV'ye özgül RNA, ölümcül insan olgularının otopsi materyallerinden toplanan beyin örneklerinden tanımlanmıştır (17-20). 1999 yazı sonu itibariyle 59'u hospitalize edilmiş 62 hasta akut BNV enfeksiyonu olarak raporlanmıştır (21).

BNV'nin Kuzey Amerika'ya nasıl taşındığı halen bilinmemekle birlikte, New York'taki salgında izole edilen BNV suşunun kaynağının Orta Doğu olduğunu düşündüren veriler bulunmaktadır (21). New York salgınına neden olan BNV suşu, Eski Dünya suşları ile karşılaştırıldığında, New York salgını ile

eş zamanlı olarak İsrail'de görülen salgından izole edilen suş ile %99,7 oranında homolog olduğu görülmüştür (19).

BNV'nin Kuzey Amerika'ya girmesiyle virus ülke genelinde hızlıca yayılmıştır. 2000 yazında kuzeydoğu eyaletlerinde 21 insan vakası, sonraki yıl ise 10 farklı eyalette 66 vaka bildirilmiştir (22). 2002 yazında ise tüm Dünya'da kaydedilmiş en büyük BNV meningoensefaliti salgını ve batı yarımküredeki en büyük arboviral meningoensefalit salgını görülmüş, 284'ü mortal seyretmiş 2354 meningoensefalit olgusu ve toplamda 4156 BNV enfeksiyonu bildirilmiştir (23). BNV Amerika kıtasında Kanada ve Güney Amerika'ya yayılmış ve kıta günümüzde endemik hale gelmiştir (24).

2.1.2 Sınıflandırma

BNV, taksonomik olarak *Flaviviridae* ailesinin, *Flavivirus* cinsinde yer almaktadır. BNV aynı zamanda Japon ensefaliti virusu (JEV), St. Louis ensefaliti virusu (SLEV), Murray Vadisi ensefaliti virusu (MVEV) ve Kunjin virusu'nun (KUNV) da içinde bulunduğu JE serokompleksi içerisinde yer almaktadır (25).

BNV izolatlarının, filogenetik analizler ile zarf ("envelope", E) proteinlerindeki aminoasit değişiklikleri ve delesyonlara göre iki genetik kökene (lineage) sahip olduğu belirlenmiştir (26). Ancak daha sonraları, tüm veya kısmı genom dizileri çıkarılarak yapılan filogenetik çalışmalara göre, BNV'nin 5 kökeninin olduğu öne sürülmüştür (7). Bunların dünyadaki dağılımları farklılık göstermektedir.

Köken I, Afrika, Orta Asya, Hindistan, Afrika, Avustralya ve Batı yarımküredeki izolatların antijenik olarak farklı gruplarını içermektedir (27). Köken I'e ait BNV izolatları ciddi insan hastalıklarına sebep olmaktadır (26). Köken I grup 1a, dünyada görülen BNV vakalarının en çok bulunduğu gruptur. Bu grupta Afrika, Avrupa, Orta Doğu, Rusya ve Amerika izolatları yer alır. Köken I grup 1b ise, Avustralya'da izole edilmiş BNV alt tipi olan Kunjin virusun

(KUNV) yer aldığı gruptur. Köken I grup 1c'de ise, Hindistan izolatları yer almaktadır (28).

Köken II ise, Afrika'da sadece Sahra altı (Güney) Afrika ve Madagaskar'dan izole edilen suşları içermektedir (27). Ancak Afrika dışında ilk kez 2004 ve 2005 yıllarında Macaristan'da, atmacalardan köken II'ye ait BNV izole edilmiştir (29). Daha sonraları Avusturya, Yunanistan, İtalya ve Rusya'dan da köken II'ye ait BNV bildirimleri yapılmıştır (30). Ayrıca 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada, 1968 yılında Kıbrıs adasında meydana gelen salgından izole edilen BNV izolatının da bu kökene ait olduğu tespit edilmiştir (28).

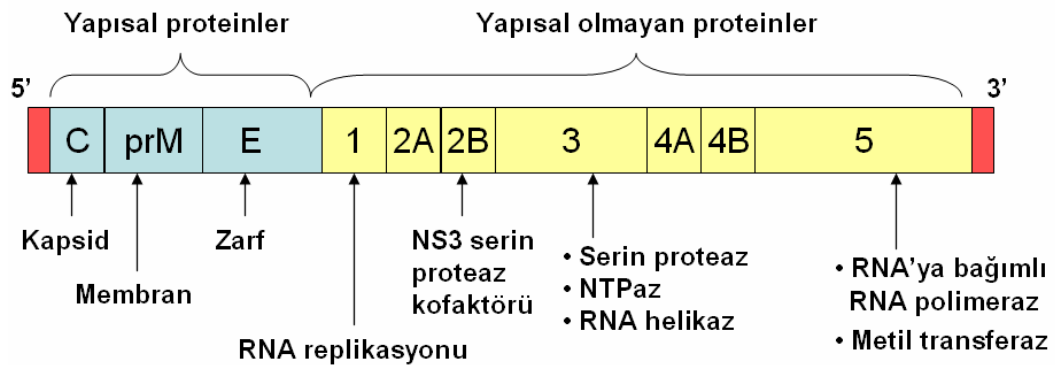
Bazı istisnalar olsa da, genelde köken I (grup Ia) insanlarda oldukça patojenik suşları içermekte olup ciddi nörolojik hastalığa sebep olabilmektedir, buna karşın köken I (grup Ib) ve köken II virusları genelde orta şiddette, kendini sınırlandıran hastalığa sebep olmaktadır (7). Köken II suşları, köken I'e göre daha az virulan özellikte olduğu kabul edilmektedir, ancak son yıllarda Güney Afrika suşlarının ciddi ensefalit olguları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Birinci köken suşlarının genellikle ciddi ve nöroinvaziv hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmekle birlikte, son çalışmalarda her iki kökende de yüksek ve düşük nöroinvaziflik ile ilişkili fenotiplerin olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda başka genetik kökenlerin varlığı bildirilmiştir (27).

Her iki kökende virulan ve attenüe suşları içermekte olup, patojenitelerindeki farklılığın, virusun prM (premembran), E (envelope) veya yapısal olmayan proteinlerindeki özgül bölgeleri kodlayan nükleotidler ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (31). BNV NS3 helikazda tek bir aminoasit farklılığı, suşlarda artmış virülans ile ilişkilendirilmiştir. Bazı BNV suşlarındaki patogenez ve nöroinvaziflikteki farklılıkların, zarf proteininin N-glikolizasyon paternindeki varyasyona bağlı olarak virion stabilitesindeki değişimden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (27).

Köken III, IV ve V' e ait viruslar hakkında bilinenler oldukça azdır (7). Köken III'de Avusturya'da sivrisineklerden izole edilen virus ve köken IV'de ise Rusya'da kene, sivrisinek ve kurbağalardan izole edilen BNV suşları yer almaktadır (28).

2.1.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon

BNV, zarflı, ikozahedral nükleokapsidli yaklaşık 45-50 nm büyüklüğünde viriona sahip, pozitif polariteli, tek iplikli bir RNA virusudur. Virusun genomu yaklaşık 12.000 nükleotide sahiptir ve genomun 5' ve 3' uçlarında protein kodlamayan bölgeler ("non-coding region", NCR) bulunur; bunların sınırlandığı genomdan virusa ait üç yapısal [kapsid proteini (C), membran öncülü protein (prM) ve zarf proteini (E)] ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b ve NS5) protein kodlanır (Şekil 2.1). Genom, tek bir polipeptid olarak transkripsiyona uğrar; viral ve hücrel proteazların etkisiyle işlevsel viral proteinler oluşur (32).



Şekil 2.1: BNV'nin Genomik Yapısı ve Proteinleri (11)

BNV'nin yapısal proteinlerinden C, ana kapsid proteindir ve genomik RNA'ya bağlanmaktadır. PreM, virusun bir araya gelişi sırasında erken viral füzyonu engellemekte ayrıca E proteininin olgunlaşmasına katkıda bulunmaktadır. E proteini ise virusun hedef hücreye tutunması, füzyonu ve

bir araya gelmesi aşamalarında görev alır. E ve M proteinleri, virusa karşı B ve T lenfosit yanıtından sorumludur. E proteini ise ayrıca virusun serotip özgüllüğünü belirler, viral hemaglutinin özelliği taşıyıcı ve nötralizan antikörlerin ana hedefidir (33, 34).

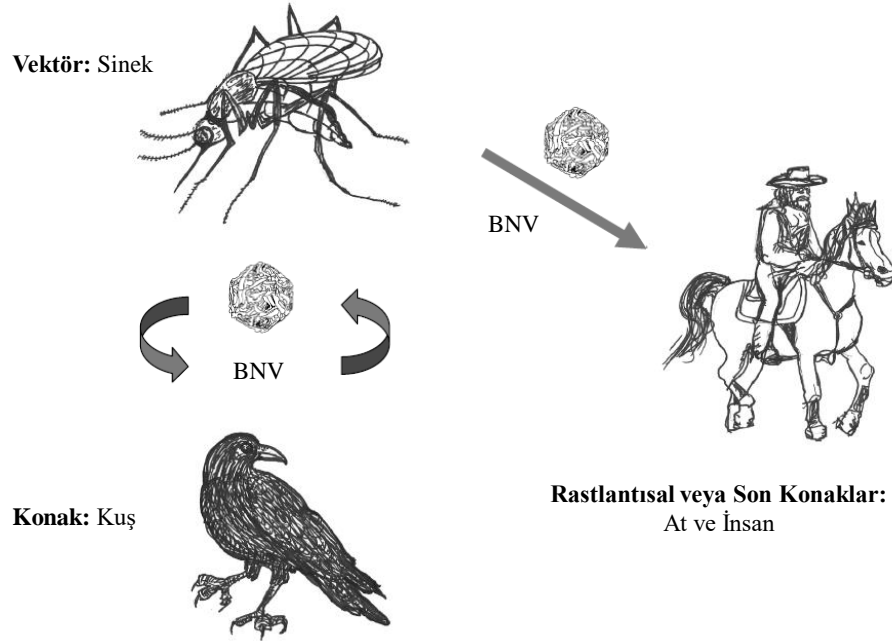
Virusun yapısal olmayan ("non-structural") proteinlerinin ana görevi ise viral replikasyon, transkripsiyonun düzenlenmesi ve konağın antiviral yanıtının modülasyonudur. Yapısal olmayan proteinlerden NS1, viral replikaz için kofaktör aktivitesi göstermesinin yanı sıra immün kaçıştan sorumlu tutulmaktadır (7). NS2a, interferon yanıtını baskılamakta, ayrıca virusun bir araya gelişinde ve salınımında rol almaktadır. NS3, proteaz, NTPaz ve helikaz aktivitesine sahiptir. NS2b de NS3'ün proteolitik aktivitesi için kofaktör görevi görmektedir. NS4a ve NS4b, hücre içi interferon sinyalizasyonunu modifiye etmektedir. NS5 ise RNA- bağımlı RNA polimeraz ve replikaz olarak görev yapmaktadır (35-39).

2.1.4 Yaşam Döngüsü

Doğada BNV'nin kalışı, 300'den fazla konak kuş türleri ile kuşlardan kan emen birçok sinek vektörleri vasıtasıyla olmaktadır. Kuşlar, virusun doğal olarak çoğaldığı konaklarıdır (26). Kırlangıç, yaban kazları gibi göçmen kuşlar ve özellikle kargalar virusun en sık etkilediği kuşlardır. Virusun tüm dünyada yayılmasında göçmen kuşların önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ara konakçılar ise *Culex* cinsi başta olmak üzere sivrisineklerdir. Virus farklı ekolojik ve davranış özellikleri gösteren 60 civarında sivrisinek türünde gösterilmiş olmasına karşın bunların tamamının bulaşmada önemli rol oynadığı kesin değildir (40, 41). İnsanlar, atlar ve diğer memelilerde enfeksiyon sırasında uzun süreli ve yüksek miktarda viremi olmadığından bu canlılar tesadüfi ve taşınma döngüsünü devam ettiremedikleri için son konak olarak kabul edilmektedirler (Şekil 2.2).

Ilıman iklime sahip bölgelerde sivrisinekler ilkbahar aylarında yumurta, larva ve pupa evrelerini tamamlayarak erişkin hale gelmektedirler. Yaz ayları boyunca, enfekte kuşlar ve sivrisinekler arasında tekrarlayan döngü sayesinde

dolaşım halindeki virus miktarı artmaktadır. Bu nedenle insan enfeksiyonları yaz sonu ve sonbaharda tepe düzeyine ulaşmaktadır. Sıcak bölgelerde ise tüm yıl boyunca bulaş söz konusu olabilmektedir (42).



Şekil 2.2: BNV'nin Doğadaki Yaşam Döngüsü

2.1.5 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

BNV'nin in-vitro koşullarda hücre yüzeyinde bağlandığı moleküller arasında yüzey lektinlerinden DC-SIGN, DC-SIGNR ve integrin $\alpha_v\beta_3$ belirtilmiş olmakla birlikte patogenezde önemli hücrelere girişte kullanılan reseptör henüz kesin olarak gösterilememiştir (38). Virus, hücre reseptörüne tutunmanın ardından reseptöre bağımlı endositoz mekanizmasını kullanarak, klatriin kaplı çukurcuklar ile hücre içerisine alınmaktadır. E proteinindeki pH'ya bağlı konformasyonel değişikliğin ardından virus zarfı ile endozomal membranın füzyonu gerçekleşmekte ve nükleokapsid sitoplazmaya geçmektedir (43). Endoplazmik retikulumla ilişkili membran sisteminde virus, replikaz enzimini kullanarak genoma komplementer negatif polariteli RNA sentezler ve bu molekülü kalıp olarak kullanarak yeni pozitif polariteli viral RNA'ların oluşmasını sağlamaktadır. Sentezlenen RNA'lar ya yeni viral proteinlerin sentezini

sürdürmekte ya da kapsid içine paketlenmektedir. Virusun olgunlaşması endoplazmik retikulumda olmaktadır. Endoplazmik retikulumda tomurcuklanan olgunlaşmamış partiküller prM proteini içermektedirler. Trans-golgi ağında transport esnasında prM proteininin parçalanmasıyla olgun M proteini içeren enfektif virion oluşmakta ve ekzositozla hücreyi terk etmektedir (44).

BNV, enfekte ettiği hücrelerde sitolitik etki göstermekte, ayrıca apoptozisi indüklemektedir (45). Geniş bir hücre tropizmine sahip olan BNV'nin çeşitli omurgalı türlerinde ve kuşlarda enfeksiyon oluşturabilmesi, birçok farklı ya da türler arasında korunmuş molekülleri reseptör olarak kullanabildiğini göstermektedir (38). Virusun konağa inokülasyonu sonucu ilk replikasyon deri Langerhans hücrelerinde gerçekleşmektedir (46). Langerhans hücrelerinin göçü ve bölgesel lenf nodlarına ulaşmasının ardından viremi ortaya çıkmaktadır. Viremi sırasında dalak ve böbrek gibi periferik organların enfeksiyonu görülmektedir. Daha sonra BNV, immün yanıtın etkisiyle serum ve diğer organlardan temizlenmekte, ancak hayvanların bir bölümünde merkezi sinir sistemi enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır. Virusun kan-beyin bariyerini aşma mekanizmaları tam olarak açıklanmamış olmasına karşın, endotel hücrelerinde çeşitli sitokinlere bağlı geçirgenlik artışı sorumlu tutulmaktadır (47). Merkezi sinir sisteminde BNV, beyin, beyin sapı ve medulla spinalis'te bulunun nöronları enfekte etmekte ve en belirgin olarak medulla spinalis ön boynuz hücrelerinde ve beyin sapında hasar görülmektedir.

BNV enfeksiyonlarında, maruziyet sonrası inkübasyon süresi 2-15 gün arasında değişmekle birlikte genel olarak 2-6 gündür (48). BNV enfeksiyonu çoğu olguda klinik olarak asemptomatik seyretmektedir. Buna karşın enfekte her 5 kişiden 1'inde semptomlar görülmektedir. Semptomatik seyreden kişilerde tipik olarak 3-6 günde sonlanan grip benzeri semptomlar, ani ateş yükselmesi, baş ağrısı, miyalji, halsizlik, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma olduğu bildirilmektedir. Bazı durumlarda makülopapüler veya roseolar döküntü gözlenebilmekte; nadiren myokardit, pankreatit ve fulminan hepatit gelişebilmektedir (31, 49). BNV ile enfekte olan kişilerin %1'den azında

menenjit, ensefalit veya meningoensefalit gibi merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonları görülebilmektedir (50). İleri yaş nörolojik tutulum açısından en önemli risk faktörü olmakla beraber; 50 yaş üzeri kişilerde MSS enfeksiyonu gelişim riski 10 kat, 80 yaş üzeri kişilerde ise 43 kat daha yüksektir (51). Meningoensefalit MSS tutulumu olan hastalarda en sık görülen klinik tablodur ancak izole menenjit veya ensefalit de görülebilmektedir. MSS tutulumu olan hastalarda değişik derecelerde ensefalopati ile birlikte ense sertliği görülmektedir. BNV'e bağlı akut flask paralizi sık olarak görülmekte; nispeten genç hastalarda, duysal tutulumun olmadığı, asimetric paralizi olduğu bildirilmektedir. Ekstrapiramidal belirtiler, ataksi, miyelit, optik nörit daha az sıklıkta görülen nörolojik bulgulardır (52). Günümüzde BNV enfeksiyonlarının özgül bir tedavisi olmayıp, semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanmaktadır (50).

BNV enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında virusun izolasyonu, viral antijenler ya da nükleik asidin saptanması ve virusa karşı oluşan özgül immün yanıtın gösterilmesi yaklaşımları uygulanmaktadır. Virusun izolasyonu, hücre kültürlerinde üretilebilen diğer viruslarda olduğu gibi BNV için de altın standart yöntemdir. Ancak yüksek viremi izlenen vektörler ve kuşlar dışında izolasyon çalışmaları genellikle olumlu sonuç vermemektedir ve günümüzde yerini beyin/BOS'ta özgül nükleik asit saptanmasına bırakmıştır (40, 53-55). Viral RNA'nın RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; ters transkripsiyonlu polimeraz zincir tepkimesi) yöntemiyle saptanması tanı ve tarama amaçlı uygulamalarda sık olarak yararlanılan bir yaklaşımdır (54). Viral genomun farklı bölgelerini hedef alan primer/prob setleri, ayrıca standart/"nested" RT-PCR ve standart/gerçek zamanlı RT-PCR yaklaşımları kullanılmaktadır. Viral RNA'nın saptanması genel olarak analitik duyarlılığı çok yüksek olan bir yöntemdir. Ayrıca kantitatif sonuç elde edilmesi de mümkündür (54, 56, 57). BNV'ye bağlı enfeksiyonların tanısında serolojik testlerle özgül antikorların varlığının tespiti yaklaşımı da sıklıkla uygulanmaktadır ve intratekal özgül antikorların gösterilmesi MSS enfeksiyonları lehine güçlü bir kanıttır (53).

BNV antikorlarının saptanması için enzim temelli immünolojik yöntemler (ELISA), indirekt immüno Floresan testi (IIFT) gibi yöntemler kullanılmakta; bu ve benzeri yöntemlerde diğer flaviviruslarla ortaya çıkan çapraz reaksiyonların ekarte edilerek antikor özgüllüğünün doğrulanması amacıyla da plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) gibi yöntemler uygulanmaktadır (58).

2.1.6 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

Batı Nil enfeksiyonu, vektör aracılığı ile bulaşan virus enfeksiyonları arasında dünyada en yaygın görülen arboviral enfeksiyondur. Coğrafi olarak dağılımının bu kadar genişlemesine, iklim değişikliklerinin yanı sıra insan aktivitelerinin de katkısı bulunduğu düşünülmektedir. Artan taşımacılık (insan, hayvan, bitki vs.), vektör kontrol programları, şehirleşme projeleri ve askeri aktiviteler etkisi olduğu düşünülen diğer faktörlerdendir (59).

Batı Nil virusunun, kuşlara bulaşması çoğunlukla enfekte sivrisineğin kan emmesi sırasında gerçekleşir. Ek olarak kuşlar arasında oral ve fekal-oral bulaşlar olduğu da gösterilmiştir (60). Özellikle göçmen kuşlar aracılığı ile dağılımı genişleyen virus, göçmen olmayan kuşlarla da bulunduğu bölgede devamlılığını sürdürmektedir. Virusun insan ve atlara bulaşında da en etkin yol enfekte sivrisineğin kan emmesidir. Bunun yanı sıra kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, organ transplantasyonu, transplasental yol ve anne sütü ile de bulaşın meydana geldiği gösterilmiştir (61).

BNV insidansı, Kuzey Amerika, Avrupa ve Akdeniz havzasında ılıman iklime sahip bölgelerde mevsimsel özellik göstermekte ve en yüksek virus aktivitesi temmuz-ekim ayları arasında izlenmektedir (2, 15). Amerika Birleşik Devletleri'nde virusun güneye yayılımıyla birlikte insan olgularının saptandığı süre genişlemiş ve nisan-aralık aylarını da içine almaya başlamıştır (15). Güney Afrika'da ise bulaşma, yılın ilk ilkbahar ve yaz yağmurları ile artış göstermektedir (62).

Eski dünyada BNV'ye bağlı enfeksiyonlar 50 yılı aşkın bir süredir saptanmakta ve vektör sivrisinekler, at, insan ve diğer çeşitli konaklardan Afrika, Avrupa, Akdeniz ve Ortadoğu, Asya'nın çeşitli diğer bölgeleri ve Avustralya'dan (Kunjin virus) rapor edilmektedir. İlk zamanlarda düşük patojeniteye sahip bir ajan olarak kabul edilen BNV'nin etken olduğu ve ensefalit olgularının izlendiği epidemiler, 1951-54 ve 1957 yıllarında İsrail, 1962-63 yıllarında Fransa ve 1974 yılında Güney Afrika'da saptanmıştır. Takip eden yıllarda Akdeniz havzasında saptanan belli başlı BNV epidemileri Cezayir, Fas, Tunus, Romanya, Çek Cumhuriyeti, İsrail, Rusya ve Fransa'dan rapor edilmiştir (11, 15, 40, 63, 64). Son olarak daha önceden diğer konaklarda duyarlı virusun varlığı tanımlanmış olan İtalya ve Macaristan'da insan BNV olguları saptanmış; 2010 yılı temmuz-ağustos aylarında ise Yunanistan'dan ilk kez BNV'nin etken olduğu bir salgın bildirimini yapılmıştır (65-68) (Tablo 2.1). 1999 yılından önce batı yarıkürede rastlanmayan BNV, 1999'da önce New York şehrinde saptanmış, daha sonra hızla Amerika Birleşik Devletleri'nde yayılarak kuzeyde Kanada ve Güney Amerika'ya ulaşmıştır (19, 64, 69).

BNV enfeksiyonlarında özgül bir antiviral tedavi bulunmamakta, semptomların şiddetine göre destekleyici tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. In vitro çalışmalarda ribavirin, alfa-interferon ve pirazidin nükleotidlerinin antiviral aktivitesi saptanmış olmasına karşın, bu bileşiklerin klinik kullanımına ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Tedavi ve profilaksi amacıyla hiperimmün serum uygulamasının etkinliği ile ilgili veriler çelişkili, kontrollü klinik çalışmalar yetersizdir. İnsanlarda kullanım ruhsatı almış bir aşı bulunmamaktadır. Enfeksiyonun önlenmesinde en önemli nokta, duyarlı kişilerle enfekte sivrisineklerin temasının, kişisel korunma önlemleri ve vektör kontrol programları ile önlenmesidir (31, 40).

Tablo 2.1: Avrupa Birliği ve Bazı Komşu Ülkelerde 1990-2010 Yılları Arası Saptanan BNV Aktivitesi (*: Sivrisineklerde BNV saptanması) (65-68)

Ülke	Yıl	Türler/Klinik Semptomlar		
		İnsan	At	Kuş
Cezayir	1994	var		
Avusturya	2008			bilinmiyor
Hırvatistan	2001-2002		yok	
Çek Cumhuriyeti*	1997	var		
	2004-2006			yok
Fransa*	2000		var	
	2003-2004-2006	var	var	
Yunanistan	2010*	var		
Macaristan	2003-2008	var		
İsrail	1998-1999		var	var
	2000	var		
İtalya*	1998	yok	var	yok
	2008-2009	var	var	yok
Fas	1996-2003		var	
Polonya	2006			yok
Portekiz	1971*			
	2004*	var		
Romanya	1996	var	var	var
Rusya	1999-2005-2006	var		
İspanya	2003-2005			yok
	2004	var		
Tunus	1997	var		

2.1.7 Türkiye'deki Durum

Türkiye, BNV için endemik kabul edilecek bir coğrafyada bulunmaktadır. Batı Nil virusunun Türkiye'deki varlığına ilişkin ilk veriler Ari ve Meço'nun hemagglütinasyon inhibisyon (HI) yöntemiyle yaptığı çalışmalara ait olup; Batı Anadolu'da insanlarda %6, koyunlarda %1.5, Güneydoğu Anadolu'da insanlarda %38-47.8 arasında değişen oranlarda antikor prevalansı saptanmıştır (70). BNV'nin varlığını kanıtlayan ilk çalışma ise 1971 yılında, Ankara ve Hatay illerinde yapılmış, koyunlarda sırasıyla %20 ve %0.9 oranında BNV'ye karşı nötralizan antikor varlığı bildirilmiştir (71). 1980 yılında Ege

bölgesinde yapılan bir çalışmada 1074 kişinin %29.1'inde BNV antikoru saptanmış, pozitif sonuçların %74'lük bölümü de nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (72). Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa, Bursa ve Ankara'yı kapsayan bir çalışmada, büyükbaş hayvanlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5, katırlarda %2.5, insanlarda %20.4 ve koyunlarda 1% oranlarında BNV nötralizan antikoru gösterilmiş, incelenen bütün bölgelerde BNV maruziyeti saptanmıştır (73). Güneydoğu Anadolu'da Şanlıurfa ve Siverek bölgelerinde, 2007 yılında yapılan bir araştırma, sağlıklı kişilerde %9.4 oranında BNV nötralizan antikor varlığı gösterilmiştir (74). İç Anadolu bölgesinde kan donörlerinde yapılan bir taramada seroprevalans %0.56 olarak bulunmuş; Ankara, Konya, Yozgat ve Sivas'ta yaşayan kişilerde virusa maruziyet doğrulanmıştır (75). Hastanemiz kaynaklı, 2011 yılına ait diğer bir çalışmada ise sağlıklı kan donörlerinde %0.8 oranında nötralizan antikor varlığı bildirilmiştir (76). Bu sonuçlara karşın ülkemizde iyi tanımlanmış BNV olgularına 2009 yılına kadar rastlanmamış; 2009 yılında rapor edilen olgular ve 2010 yılında Ege bölgesinde izlenen BNV salgını, semptomatik ve nöroinvazif BNV enfeksiyonlarının varlığını ortaya koymuştur (77-80). Ayrıca 2009-2014 yılları arasında, aralarında hastanemiz kaynaklı olguların da olduğu; MSS tutulumu ve/veya ateşli hastalık şeklinde izlenen çeşitli sporadik BNV enfeksiyonu bildirimleri yapılmıştır (81, 82).

2.2 Kene Kaynaklı Ensefalit Virusu

2.2.1 Tarihçe

Kene kaynaklı ensefalit (KKE), kene kaynaklı ensefalit virusu (KKEV) tarafından oluşturulan, özellikle Asya ve Kuzey Avrupa ülkelerinde görülen ciddi nörolojik enfeksiyonlar arasında yer alan bir hastalıktır (83). İskandinav kilise kayıtlarına göre ("Åland Islands", Finlandiya) KKE'ye dair ilk bilgiler 18. yüzyıla dayanmasına rağmen, klinik olarak ilk kez Schneider tarafından 1931 yılında, Rusya'da benzer ensefalit vakalarının mevsimsel ilişkilerinin fark edilmesiyle tanımlanmıştır (84, 85). Rusya Sağlık Bakanlığı, 1937-1939 yılları arasında,

“taiga ensefaliti” olarak adlandırılmış hastalığın etiyolojisini aydınlatmak amacıyla Uzak Doğu Rusya’ya üç keşif gezisi düzenlemiş ve bu araştırmalar sırasında Lev Zilber hastalığın etkeninin bir virus olduğunu, insanlara *Ixodes persulcatus* türü keneler ile bulaştığını bildirmiştir (86). KKEV’nin ilk izolasyonu ise 1939 yılında, mortal seyreden bir hastanın beyin dokusundan gerçekleştirilmiştir (87). 1940 yılında, virusun izolasyonunu takiben ilk aşı denemeleri yapılmıştır (85).

Rusya’nın batı kısmında ise KKEV araştırmaları 2. Dünya Savaşı sırasında 1942-1943 yıllarında Volkhov Cephesi askerlerinde görülen KKE salgını ile başlamış, virusun Sibiryaya alt tipi izole edilmiş ve *Ixodes ricinus* türü kenelerin virusun taşınmasında rol aldığı gösterilmiştir (88). Virusun keneler ve memeliler arasındaki yaşam döngüsü ise 1947 yılında Pavlovsky ve ark. tarafından tanımlanmıştır (89).

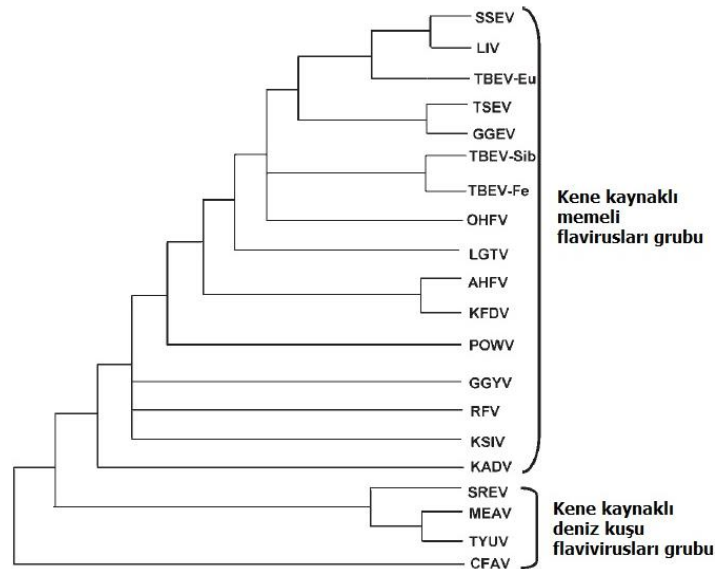
Orta Avrupa’da insanlardan ilk KKEV izolasyonu, 2. Dünya Savaşı’nın ardından 1948 yılında eski adıyla Çekoslovakya’dan bildirilmiş, *I. ricinus* türü kenelerden de virusun izolasyonu gerçekleştirilmiştir (90, 91). Çekoslovakya’dan KKE bildirimlerini takip eden yıllarda Macaristan (92), Polonya (93), Bulgaristan (94), Yugoslavya (95), Avusturya (96), Romanya (97), Almanya (98), Finlandiya (99) ve İsveç’ten (100) virus izolasyonları bildirilmiş, eş zamanlı olarak Kuzey Çin ve Japonya’dan da KKEV’nin varlığına dair raporlar yayınlanmıştır (101).

1951-1952 yıllarında Slovakya’nın Rožňava bölgesinde enfekte keçi sütü kaynaklı sıra dışı bir KKEV salgını görülmüş ve en az 660 kişinin enfekte olduğu bildirilmiştir (102, 103). Rusya’dan Petersburg ve Moskova ile Avusturya’nın Styrian bölgelerinden de süt kaynaklı KKEV salgınları bildirilmiştir (104, 105). 1999 yılında, Çek Cumhuriyeti’nde besin kaynaklı KKEV salgını görülmüş, 22 kişinin yedikleri koyun peyniri nedeniyle KKEV ile enfekte olduğu (106), 2007 yılında Macaristan’daki salgında ise pastörize edilmemiş çiğ keçi sütünün salgına neden olduğu bildirilmiştir (107).

KKE tarih boyunca Asya'da "Rusya ilkbahar-yaz ensefaliti (RSSE)" ve "Uzak Doğu ensefaliti (FEE)" olarak adlandırılırken; Avrupa'da KKE "Orta Avrupa ensefaliti", "Difazik süt ateşi" veya "Kumlinge hastalığı" olarak adlandırılmıştır (83, 108). KKE insidansı yıllar içerisinde değişmekle beraber 1980'lerin ortasına kadar giderek artmış, yine aynı yıllarda Avusturya'da başlatılan sistematik aşılama politikaları sayesinde anlamlı düşüş sağlanabilmiştir (109).

2.2.2 Sınıflandırma

KKEV *Flaviviridae* ailesi, *Flavivirus* cinsi içerisinde yer almaktadır. Genetik ve antijenik olarak benzerlik gösterdiği "Omsk hemorrhagic fever virus" (OHFV), "Langat virus" (LGTV), "Alkhurma hemorrhagic fever virus" (AHFV), "Kysanur Forest disease virus" (KFDV), "Powassan virus" (POWV), "Royal Farm virus" (RFV), "Karshi virus" (KSIV), "Gadgets Gully virus" (GGYV) ve "Louping ill virus" (LIV) ile birlikte KKEV serokompleksi olarak da adlandırılan "kene kaynaklı memeli virusları" alt grubunda yer almaktadır (110)(Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Kene Kaynaklı Flavivirusların Filogenetik Analizi (111)

KKEV'nin coğrafi dağılım farklılıklarına göre Uzak Doğu, Sibirya ve Avrupa olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır (112). KKEV'nin farklı alt tipleri ile

oluşan enfeksiyonlarda klinik seyir farklı olup, Avrupa alt tipi iki fazlı seyreden daha ılımlı bir klinik tabloya yol açarken, Uzak Doğu alt tipi ile oluşan enfeksiyonlar daha mortal seyretmektedir (108, 113). KKEV'nin dışında LIV, LGTV ve POWV de insan ve hayvanlarda ensefalite neden olmakta ancak nadir görülmekte ve salgına yol açmamaktadırlar (112).

2.2.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon

KKEV, zarflı, küresel yapılı, 40-60 nm büyüklüğünde viriona sahip; tek iplikli, pozitif polariteli RNA içeren bir virustur. Viral zarf, E ("envelope") ve M ("membrane") olmak üzere iki glikoprotein içeren lipid yapıdan oluşmaktadır (114). Viral genom yaklaşık 11.000 nükleotit uzunluğundadır ve diğer flaviviruslarda olduğu gibi 3' ve 5' uçlarında "NCR" bulunmaktadır. Protein kodlamayan 3' ve 5' uçları genomun amplifikasyonu, translasyonu ve paketlenmesinde rol almaktadır (115). Genomik RNA 3414 aminoasitlik tek bir poliprotein sentezleyen açık okuma alanına sahiptir ve bu poliproteinden post-translasyonel modifikasyonla üç yapısal [kapsid (C), membran öncülü (prM) ve zarf (E)] ve yedi yapısal olmayan (NS1, NS2A-NS2B, NS3, NS4A-NS4B-NS5) protein oluşmaktadır (116). Yapısal proteinlerden C proteini viral nükleik aside bağlanarak nükleokapsidi oluşturmaktadır ve 20 aminoasitlik olgunlaşmamış bir polipeptid olan CTHD ("C-terminal hydrophobic domain") taşımaktadır. CTHD'nin serin proteazlar ile kısa CTHD proteinine dönüştürülmesinin, virionun olgunlaşmasında önemli olduğu düşünülmektedir (117). prM proteini zarf proteinlerinden M proteininin öncülü olarak rol almaktadır. E proteini ise virusun majör antijenik determinanı ve virülans faktörüdür. Ayrıca hücre reseptör ligandı ve füzyon proteini olarak görev almaktadır (118).

Yapısal olmayan proteinlerden NS1 komplemanı bağlamaktadır. NS2B ve NS3 viral serin proteazlardır. NS5 RNA bağımlı RNA-polimeraz iken NS2A, NS4A ve NS4B replikasyon kompleksinde görev almaktadır (117, 118). NS5 proteininin ayrıca STAT1 fosforilasyon inhibisyonu yaptığı ve interferon antagonisti olduğu gösterilmiştir (119).

2.2.4 Yaşam Döngüsü

KKEV'nin vektörleri, özellikle *Ixodes* cinsine ait sert kenelerdir. Virusun ana konak ve rezervuarları küçük kemirgenler olup insanlar tesadüfi konaktır. İnek, koyun, domuz gibi bazı memeli hayvanlar tesadüfi konak olabildikleri gibi virusun aktarılmasında da rol oynayabilmektedir (120). Omurgalı konakların, saptanabilir düzeyde viremi geliştirmedeği durumlarda dahi virusun aktarımında rol oynadıkları gösterilmiştir (121). KKEV, 14 kene türünü enfekte edebilse de başlıca iki tür bulaşta önemli yer tutmaktadır. KKEV Avrupa alt tipine *I.ricinus* türü keneler, Uzak Doğu ve Sibiryaya alt tipine ise *I.persulcatus* türü keneler temel vektör görevi yapmaktadır (122).

KKEV'nin vektörü olan keneler 11°C ve üzeri sıcaklık ile %70-80 rölatif nem oranında biyolojik olarak aktif hale gelmektedir (123). Asya ve Avrupa'nın ormanlık bölgelerindeki yoğun bitki örtüsünün oluşturduğu yüksek nem oranı ve sıcaklık keneler için ideal habitat sağlamaktadır (112). KKEV'nin mevsimsel paterninin altında yatan nedenin virusun vektörü olan kenelerin özellikle nisan-mayıs aylarında popülasyonlarındaki pik ile rezervuarlarda eş zamanda beslenmedeki artışa ("coincident feeding") bağlı olduğu düşünülmektedir (124). Eş zamanlı beslenme, duyarlı rezervuarda enfekte ve enfekte olmayan vektörün aynı anda ve aynı bölgede beslenmesidir. Virus vektörün orta bağırsak hücrelerine girişini takiben replike olmaya başlamakta ve hemolenfatik sistem aracılığı ile kenenin tükrük bezlerine göç etmektedir (125). Keneler larva, nimfa ve erişkin olmak üzere 3 evrede de enfekte olabilmekte ancak sayıca erişkinlerden daha fazla olması nedeniyle nimf evresindeki kenelerin virusun yayılımında daha önemli yer tuttuğu düşünülmektedir (126). Enfekte olan keneler yaşam döngüleri boyunca enfekte kalmakta; transovaryal, çiftleşme sonrası ve transtadiyal (evreden evreye nakil) aktarım görülebilmektedir (127).

Duyarlı rezervuara bulaş, enfekte vektörün beslenmesinin başlangıcından itibaren meydana gelmektedir. Bir kez bulaş gerçekleşikten

sonra rezervuarda viremi birkaç gün sürmekte ancak persistan enfeksiyon aylarca sürebilmektedir. Bu sürede virus rezervuarın beyin ve iç organlarında saptanabilmektedir. Bu sayede virus endemik bölgelerde kış ayları boyunca dolaşımına devam edebilmektedir (128).

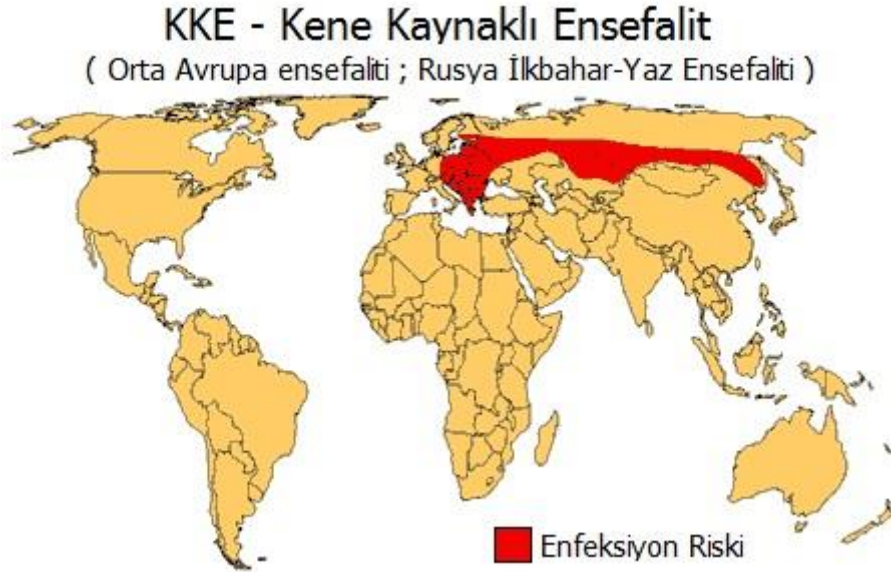
2.2.5 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

KKEV, insanlara çoğunlukla kene ısırması ile bulaşmaktadır (108). Enfekte çiğ süt ve pastörize edilmemiş peynir ile KKEV enfeksiyonu gelişebilmektedir ancak ensefalit vakası bildirilmemiştir (129). KKEV enfeksiyonları asemptomatik ya da grip benzeri ateşli hastalık şeklinde hafif semptomatik olabildiği gibi, enfekte kişilerin yaklaşık üçte birinde merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır (130). Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları hafif menenjit bulgularından ağır ensefalite kadar değişebilen şekilde ortaya çıkabilir ve olgularda kalıcı nörolojik sekel bırakabilmektedir. Virusa maruziyet sonrası inkübasyon süresi 2-28 gün arasında değişmekle birlikte ortalama 7 gündür (131). Semptomatik vakalarda hastalık %74-87 oranında bifazik seyir göstermektedir (132). Birinci faz viremi fazıdır ve yaklaşık 2-10 gün sürmektedir. Ani başlangıçlı ateş, halsizlik, baş ve kas ağrıları, bulantı gibi grip benzeri semptomlar görülmektedir (131, 133). %13-26 vakada hastalık viremi fazının ardından iyileşmekte ve ikinci faz görülmemektedir. Enfekte hastaların %20-30'unda viremi fazını 1-33 günlük semptomsuz dönem izlemekte, ateşin yeniden yükselmesi ile başlayan ikinci fazda nörolojik semptomlar ortaya çıkmaktadır (134). Konsantrasyon ve hafıza kaybı gibi bilişsel bozuklukların yanı sıra meningeal irritasyon bulguları, ataksi, tremor, konfüzyon, kraniyal ve solunum kas paralizileri gibi ciddi nörolojik tutulumlar görülebilmektedir. Hastaların önemli bir kısmında çeşitli sekeller kalmakta; birinci yılın sonunda %40 hastada bilişsel ve nöropsikiyatrik semptomlar, % 2-6 hastada kalıcı paraliziler görülmektedir (135). Tam iyileşme aylarca sürebilmektedir (136).

KKE'nin kliniği karakteristik değildir ve tanıya yardımcı herhangi bir özellik göstermez. Tanı anamnez ve laboratuvar bulguları ile konulmaktadır. Anamnezde hastanın KKE için riskli bir bölgede bulunmuş olması gibi epidemiyolojik bilgilerin önemi büyüktür. Kene ısırmasının hikayesi olabilir ancak kural değildir. Hastalığın viremi döneminde viral nükleik asit, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ya da diğer nükleik asit testleri ile saptanabilir. Viral RNA'nın PCR ile saptanmasına yönelik bir kalite kontrol çalışmalarında en tutarlı sonuçlar 3' NCR bölgesinden tasarlanmış prob ve primerlerin kullanıldığı bir gerçek-zamanlı PCR yöntemini uygulayan laboratuvarlardan bildirilmiş, nükleik asit ekstraksiyonunda ticari kitlerin kullanılmasının da daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, NS1 bölgesini hedef alan prob ve primerlerin kullanıldığı bir gerçek-zamanlı PCR ile de virusun her üç alt tipinin benzer bir duyarlılıkla saptanabildiği bildirilmiştir (137-139). Ancak hastalar çoğunlukla ikinci fazda başvurmaktadırlar ve bu yüzden nükleik asit saptanmasına dayalı tanı testlerinin pratikte değeri düşüktür (137). Bu nedenle KKE tanısı özgül IgM ve IgG antikorlarının serolojik testlerle tespitine dayanmaktadır. Serolojik testler arasında, ELISA ve IIFT kullanılabilir (138). Birinci fazın sonunda antikorlar pozitifleşmeye başlayarak hızla yükselmekte ve hastalığın ikinci fazda çoğunlukla pozitif bulunmaktadır (137). İntratekal antikor yapımı serumda antikorların pozitifleşmesinden 1-2 gün sonra başlamaktadır. BOS'ta nörolojik semptomların ortaya çıktığı sırada vakaların sadece %50'sinde özgül antikorlar pozitif iken 10 gün sonra vakaların hemen hepsinde pozitif bulunmaktadır. IgM sınıfı antikorlar 2-6 ay boyunca pozitif kalabilmektedir. Diğer flaviviruslarla çapraz reaksiyonlar nedeniyle yalancı pozitiflikler elde edilebildiğinden antikor özgüllüğünün doğrulanmasında PRNT yöntemi kullanılması gerekmektedir (137). Virus embriyonlu yumurta, yeni doğmuş fare ve domuz böbrek hücre kültürleri gibi çeşitli hücre hatlarında üretilebilmektedir. Ancak vireminin, hastalığın ilk fazı ile sınırlı olmasından dolayı virus kültürünün rutin tanıda yeri yoktur. Virus hücre kültürü, 'rapid fluorescent focus inhibition test' (RFFIT) gibi nötralizasyon testleri için kullanılabilir (108, 137).

2.2.6 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

KKE, Avrupa ve Asya'da görülen en ciddi merkezi sinir sistemi enfeksiyonlardandır ve Orta Avrupa-İskandinav Yarımadası'ndan Uzak Doğu Asya'ya kadar geniş bir alanda, daha çok ormanlık bölgelerde endemik olarak görülmektedir (83, 126) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: KKE'nin Coğrafik Dağılımı

(http://www.traveldocotr.info/files/disease/10__ImageFile__KrxuNAAeGecwvVLPnxksU.gif 'ten uyarlanmıştır.)

KKE'nin bulaşında temel rol oynayan *I.ricinus* türü kenelerin dağılım gösterdiği coğrafyalarda, KKEV seroprevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Virus daha ziyade Asya ve Avrupa'nın kuzey enleminde bulunan ülkelerinde yaygındır (140). Rusya tüm dünyada KKEV'nin en yaygın görüldüğü ülkedir. KKE'nin yeni tanımlanmaya başladığı 30'lu ve 40'lı yıllarda 200 vaka/yıl bildirilirken 1956 yılında pik (5.163 vaka/yıl) yaşanmış, vakalarda azalma ve plato fazının (3500 vaka/yıl) ardından 1964 yılında ikinci bir pik (5.204 vaka/yıl) görülmüştür. 1974 yılında kadar KKE insidansında belirgin

düşme görülmüş ardından 1999 yılına kadar insidansta belirgin artış (9.955 vaka/yıl) gözlenmiştir. 2000'li yıllardan itibaren insidansta düşüş ile birlikte 2008 yılında 2.796 KKE vakası bildirilmiştir (85). Komşumuz olan Yunanistan KKEV endemik haritasında şüpheli ülkeler arasında gösterilmektedir (141). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada (142), 921 sağlıklı bireyin %2'sinde; Litvanya'da (143) ise 1488 sağlıklı bireyin %2.9'unda KKEV seropozitifliği saptanmıştır.

KKEV enfeksiyonlarının özgül bir tedavisi olmayıp, semptomatik ve destekleyici tedavi uygulanmaktadır (50). KKEV için yüksek koruyuculuk oranına sahip aşilar üretilmekte ve endemik bölgelerde kullanılmaktadır (140). İlk aşı çalışmaları virusun izolasyonunu takiben 1940 yılında başlamıştır. 1971 yılında Avusturya'da, bölgeden izole edilmiş bir suş (Neudörfl suşu) kullanarak inaktive aşı geliştirmiştir. 400.000'den fazla kişiye bu aşının uygulandığı ve 2 doz sonrasında %90'ın üzerinde serokonversiyon görüldüğü bildirilmiştir (144). 1976 yılında ise daha güçlü yanıt oluşturan ve daha az yan etkisi olan ilk ticari aşı FSME-IMMUN® geliştirilmiş ve risk gruplarında aşilama için onay almıştır (145, 146). 80'li yılların başından itibaren Avrupa'da aşilama kampanyalarına başlanmıştır. Avusturya'da KKE vakalarında anlamlı azalma sağlanırken diğer ülkelerde değişen derecelerde başarı sağlanabilmiştir (147). Günümüzde kullanımda olan en az 4 aşı bulunmaktadır. (148). FSME-Immune aşısı Neudörfl izolatu, Encepur aşısı K23 izolatu, Rusya'da geliştirilen aşilar ise Sofjin izolatlari kullanilarak üretilmiştir (149).

Aşilamanın yanı sıra vektör kontrolü ve sürveyans endemik bölgelerde korunma için önemlidir. Kenelere karşı riskli bölgelere giderken açıkta kalan vücut kısımlarına kovucuların uygulanması, uzun kol ve paçalı giysilerin giyilmesi, paçaların çorap içlerine sokulması ve çoraplara insektisid uygulaması, kırsal aktivitelerden sonra vücudun kene tutunması açısından kontrol edilmesi gibi önlemler önerilmektedir.

2.2.7 Türkiye'deki Durum

Ülkemiz KKE açısından endemik bölgelerle benzer iklim ve ekolojik şartlara sahip olmakla birlikte KKEV aktivitesi hakkında bilgiler kısıtlıdır (140). Ülkemizde KKEV ile ilgili ilk veriler 1968 yılına ait olup, İzmir'de nedeni bilinmeyen üç MSS enfeksiyonu hastanın serumunda hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testi ile artmış KKEV antikor titresi saptanmıştır (150). 1980 yılında, yine Ege Bölgesi'nde 1074 sağlıklı yerel halk ile yapılan bir seroprevalans çalışmasında KKEV seropozitifliği HI testi ile %1.4, nötralizasyon testi ile %1.2 olarak bulunmuş ve bu bölgede KKE'nin sporadik olarak görülebileceği belirtilmiştir (72). 2007 yılında Güneydoğu bölgesinde yapılan bir çalışmada, Şanlıurfa ve Siverek'te yaşayan kişilerde ELISA yöntemi ile KKEV IgG pozitifliği %10.5 (19/181), KKEV IgM pozitifliği ise %5 (9/181) olarak bildirilmiştir (74). 2009 yılında Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak'tan temin edilen 2454 sağlıklı kan donöründe KKEV seroprevalansı ELISA ve IIFT ile %1.9 oranında saptanmış ve ormanda çalıştığı belirtilen bir kişinin pozitif örneği PRNT ile doğrulanmıştır (151). Aynı çalışmada, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu bulgusu olan ve etiyolojisi bilinmeyen 108 hastadan alınan serum örneklerinde %7,4 (8/108) oranında KKEV IgM pozitifliği bulunmuş, bir hastada kene ısırığı öyküsü olduğu bildirilmiştir. 2010 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada, Sinop'ta 273 kişiden toplanan serum örneklerinde IIFT ile %2.6 oranında KKEV IgG pozitifliği bildirilmektedir (152). 2014 yılında Mersin ilinde yapılan araştırmaya 920 sağlıklı kan donörü dahil edilmiş ve IIFT ile 2 örnekte KKEV IgG pozitifliği bulunmuş ancak PRNT ile negatif sonuç alınmıştır (153).

2.3 Toskana Virus ve Diğer Fleboviruslar

2.3.1 Tarihçe

Tarihi belgeler muhtemel kum sineği kaynaklı ilk salgınların Napolyon savaşları sırasında görüldüğünü düşündürmektedir (154). Ancak kum sineği ateşi klinik olarak ilk kez hastalığın endemik formda görüldüğü Balkanlarda, 1886 yılında Alois Pick tarafından tanımlanmıştır (155). Hastalığın bulaşında rol olan kum sinekleri (*Phlebotomus* spp.) Bosna-Hersek'te askeri kışlalarda görülmüş, 1909 yılında filtre edilebilen ve enfekte kum sinekleri ile bulaşan bir ajanın hastalığa neden olduğu saptanmıştır (156).

İkinci Dünya Savaşı sırasında (1943-1944) İtalya'dan salgınlar bildirilmiş, yine aynı şekilde Alman, İngiliz ve Amerikan askerleri II. Dünya Savaşı esnasında Kuzey Afrika ülkelerine ve Akdeniz bölgesine giden askerler arasında, Hindistan ve Pakistan'a giden İngiliz askerlerinde büyük salgınlar yaşandığı bilinmektedir. Orta Avrupa'ya ve eski Sovyetler Birliği'ne turistik amaçlarla gidenler kişilerde zaman zaman epidemiler yaşandığı bildirilmektedir (157). Tarihteki en büyük salgının 1948'de Sırbistan'da meydana geldiği bildirilmiştir (158). Bu tarihten sonra *Flebovirus*'ların Kuzey Afrika, Ortadoğu ve Orta Asya'da insanları enfekte ettiği rapor edilmeye devam etmiştir (159, 160). Serolojik çalışmalar ve klinik gözlemlere dayanarak II. Dünya Savaşından sonra yapılan sıtma savaşına yönelik insektisit uygulamalarından sonra İtalya ve Yunanistan gibi ülkelerde hastalığın görülme sıklığının azaldığı bildirilmektedir (157, 161).

Sabin, II. Dünya Savaşı esnasında görülen İtalya epidemisinde hastalardan alınan kan örneklerinden serolojik olarak farklı iki ajan izole etmiş ve bu izolatlar "sandfly fever Sicilian virus" (SFSV) ve "sandfly fever Naples virus" (SFNV) olarak tanımlanmıştır (162). Bu tarihten sonra flebotomlardan ve insanlardan çok sayıda benzer virus izole edilmiş ve bu viruslar önce arbovirusların "flebotom ateşi" grubuna, günümüzde ise *Bunyaviridae* ailesi içerisinde yer alan *Flebovirus* cinsine dahil edilmiştir (157).

Toskana virus (TOSV) ise ilk olarak 1971 yılında bir saha çalışmasında, İtalya'dan toplanan *Phlebotomus perniciosus* türü kum sineklerinden izole edilmiştir (163). TOSV, 1980 yılında Uluslararası Arbovirus Katoloğuna dahil edilmiş ve *Flebovirus* cinsine yerleştirilmiştir. İlerleyen yıllarda İtalya'nın çeşitli bölgelerinde farklı kum sineği türlerinin yanı sıra kum sineklerinin yoğun olduğu bölgelerde *Pipistrellus kuhli* türü yarasa beyninden izole edilmiştir (164). İnsanlarda da yaygın olarak antikor yanıtının saptanması ile virusun insanlarda enfeksiyona sebep olduğu gösterilmiştir. Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan patojenite çalışmalarında, virusun nörovirülan olabileceği saptanmış ve insanlarda merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonlarında etken olabileceği ise 1983 yılında, yine İtalya'da menenjit olan bir hastanın beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndan izole edilmesiyle gösterilmiştir (165). TOSV'nin kum sineği ile bulaşan viruslar arasında nörotropik aktivite gösteren tek virus olduğu bildirilmektedir (166).

2.3.2 Sınıflandırma

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi'nin 9. raporuna göre, *Phlebovirus* cinsinde yer alan 68'i sınıflandırılmış 70 serotip, 9 serogrup veya serokompleks (SFNV, Salehabad, "Rift Valley" fever, Uukuniemi, Bujaru, Candiru, Chilibre, Frijoles ve Punta Toro) olarak gruplandırılmakta, SFSV ise ayrı bir serokompleks olarak önerilmektedir (167). Antijenik benzerliklere göre bu viruslar "Flebotom ateşi" ve "Uukuniemi" grubu olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Flebotom ateşi grubu, *Phlebotomus* cinsinde yer alan kum sinekleri ile bulaşan 55 üyeye sahipken; Uukuniemi grubu, keneler ile aktarılan 13 üyeden oluşmaktadır.

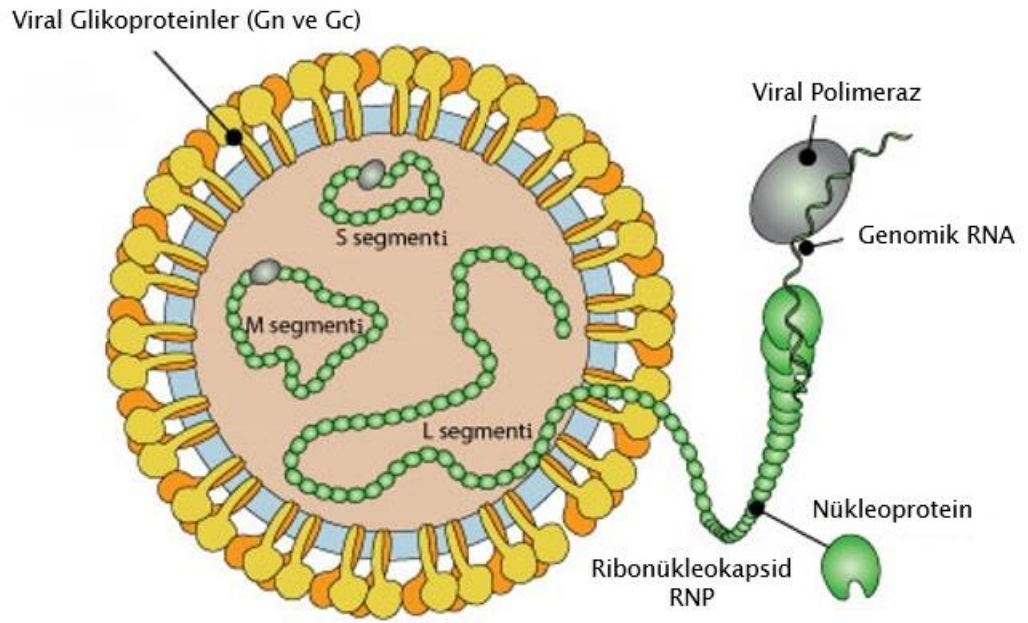
İnsanda patojen olarak saptanan Fleboviruslar; Alenquer virus, Candiru virus, Chagres virus, Punta Toro virus, Rift Valley fever virus, Napoli virusu, Sicilya virusu ve TOSV'dur (168). Bunların arasında ülkemizin de bulunduğu Akdeniz havzasında yaygın olarak bulunanlar ise Sicilya virusu (SFSV), Napoli virusu (SFNV) ve TOSV'dur (169). TOSV, önerilen gruplardan SFNV

serokompleksi içinde yer almakta, SFSV ise kendi adı verilen ayrı bir serokomplekste bulunmaktadır (170).

Son yıllarda Avrupa ülkelerinden izole edilen TOSV izolatlarının iki ayrı genotip (genotip A ile genotip B) olarak farklılık gösterdiği ortaya konmuş ve genotiplerin farklı coğrafi dağılımı olabileceği iddia edilmiştir (171). TOSV A genotipi İtalya, Fransa, Portekiz ve son yıllarda Türkiye’de saptanmış, TOSV B genotipi ise İspanya, Fransa ve Portekiz’den bildirilmiştir (172, 173). Genotip yayılımındaki coğrafi farkların, vektör türlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (174).

2.3.3 Virion Yapısı, Genom ve Replikasyon

Phlebovirus cinsinde yer alan viruslar ikozahedral yapılı, 90-100 nm büyüklüğünde, helikoidal nükleokapsid içeren zarflı viruslardır. Virus partikülü kabaca %50 protein, %20-30 lipid içermektedir. Viral genom S (“small”; 1.7-1.9 kb), M (“medium”; 3.2-4.3 kb) ve L (“large”; 6.5-8.5) olmak üzere üç segmentli, tek iplikli, negatif polariteli RNA’dan oluşmaktadır. Her üç segment, 3’ uçlarında 5’ ucuna komplementer ve cinse özgül dizilere (3’ – UGUGUUUC) sahiptir. Bu bölgelerin transkripsiyon, genom replikasyon ve paketlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (175). Her RNA segmenti nükleokapsid proteininin (N, 20-30 kDa) birçok kopyası ve büyük proteinin (L, 150-200 kDa) çok az kopyası ile birlikte bulunmaktadır (176). S segmenti 253 aminoasitlik nükleokapsid (N) proteini ile 316 aminoasitlik NSs yapısal olmayan proteinini kodlamaktadır. S segmentinin fleboviruslarda çok küçük değişikliklerle buldukları gösterilmiş ve varyant olabilecek izolatlar tanımlanmıştır. (177). M segmenti 1339 aminoasitten oluşan tek bir protein kodlamaktadır. Bu protein post-translasyonel modifikasyonla NSm yapısal olmayan proteinine ve zarf glikoproteinleri olan Gn ve Gc’ye dönüştürülür. Gn ve Gc proteinleri zarf üzerinde yaklaşık olarak 10 nm uzunluğunda çivimsi çıkıntılar şeklinde bulunmaktadır. L segmenti ise 2095 aminoasitlik viral RNA-bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır (170, 178, 179) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: *Flebovirus* Partikülünün Şematik Yapısı (http://education.expasy.org/images/Bunyaviridae_virion.jpg 'den uyarlanmıştır)

2.3.4 Yaşam Döngüsü

Flebovirusların duyarlı konaklara bulaşması, dişi kum sineklerinin kan emmesi sonucunda meydana gelir. İnsan ve diğer omurgalılarda geçici süreli görece düşük düzeyde viremi izlenmesi nedeniyle, kum sineklerini yeniden enfekte edebilme yetenekleri sınırlıdır. Bu nedenle ara konak ya da rezervuar rolü oynamaları güçtür (180) (Şekil 2.6).

Flebovirusların çoğunluğunun doğal konağı, yeni dünyada *Lutzomyia* ve eski dünyada *Phlebotomus* cinsi tatarcık türleridir, çok azı (Rift Valley, Arumowot, Itaporanga) sivrisineklerden izole edilmiştir. Avrupa'da bulunan en önemli patojen olan TOSV'nin ise bilinen vektörleri arasında *P. perniciosus* ve *P. perfiliewi* türü kum sinekleri yer almaktadır. Bu sinekler iklim koşulları uygun olmadığı durumda dördüncü safha larvada diapausa girmekte ve hava düzeldiğinde pupaya dönüşüp erişkin hale gelmektedirler. Deneysel çalışmalar

2.3.5 Patogenez, Klinik Bulgular ve Tanı

Flebovirusların vücuda doğal giriş yolu vektör kum sineklerinin kan emmesi sonucu deri altı yoluyla olmaktadır. Endemik bölgelerde viruslara maruziyet daha erken yıllarda meydana gelmekte ve sıklıkla asemptomatik serokonversiyon gelişmektedir. SFSV-SFNV ve antijenik varyantları nörotropizm göstermezken ve semptomatik enfeksiyonlar, sıklıkla "tatarcık – yakarca ateşi" ya da "üç günlük ateş" olarak adlandırılan tablo ile seyretmektedir. Fleboviruslarla meydana gelen ateşli hastalıklar tipik olarak vektör flebotomların aktif olduğu yaz aylarında izlenmektedir. Etkilenen kişilerde 3-7 günlük kuluçka süresinin ardından 6-72 saat içerisinde düşen yüksek ateş (39-40°C) ve eşlik eden halsizlik, iştahsızlık, bulantı ve kusma, baş ağrısı, kas-eklem ağrıları, sırt ağrısı, fotofobi ve retroorbital ağrı gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon semptomatik olabileceği gibi seropozitiflik saptanarak tanımlanan asemptomatik maruziyet şeklinde de izlenebilmektedir (185).

TOSV, diğer fleboviruslardan belirgin nörotropizmi, insanda nörovirülans ve merkezi sinir sistemi tutulumu göstermesi ile ayrılmaktadır. TOSV enfeksiyonlarında ateşli hastalık bulguları ortaya çıkabileceği gibi menenjit, ensefalit ya da meningoensefalit şeklinde MSS tutulumu da sıklıkla izlenmektedir. TOSV'a bağlı MSS enfeksiyonları, başta İtalya, Fransa ve İspanya gibi endemik ülkeler olmak üzere vektörlerinin bulunduğu ülkelerde özellikle yaz aylarında izlenen viral MSS enfeksiyonları arasında en önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır (3). TOSV İtalya'da Mayıs-Ekim arası dönemde çocukluk çağı menenjit ve meningoensefalitlerin %80'inden, erişkin olguların %50'sinden sorumludur (174). Bu nedenle Akdeniz ülkelerinde akılda tutulması gereken bir menenjit etkenidir. Ateş, miyalji, ciddi frontal baş ağrısı, kusma, oküler ağrı ve ense sertliğine yol açar. Diğer viral menenjitlere benzer semptomlara yol açar. Laboratuvar bulgusu olarak lökopeni, lenfositoz, monositoz ve hafif karaciğer enzim yüksekliği görülür (186). Beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesinde glukoz normal, protein düzeyi hafif artmış ve orta

derecede artmış lenfosit mevcuttur. Beyin görüntülemelerinde anormal bulgu yoktur (185). Günümüzde TOSV'a özgül bir tedavi bulunmamaktadır. Etkilenen kişilerde ağır seyreden enfeksiyonlar ve MSS tutulumu ortaya çıkan durumlarda uygun destekleyici tedavi verilmektedir (3).

Flebovirus enfeksiyonlarında virusun izolasyonu, viral nükleik asitlerin ya da virusa karşı oluşan immün yanıtın saptanması tanıda kullanılan yaklaşımlardır. Virus izolasyonu ya da nükleik asitlerinin saptanması için BOS, özgül IgG ve IgM antikorlarının gösterilmesi için serum ya da BOS kullanılabilir örneklerdir. Virusun izolasyonu hücre kültürlerinde ya da farelerde intraserebral inokülasyonla mümkündür ancak düşük duyarlılık ve pratik yöntemler olmaması nedeniyle tanıda rutin olarak kullanılmamaktadır (3). TOSV, Vero, BHK-21 gibi hücre kültürlerinde litik sitopatik etki oluşturarak ürer ve zarf glikoproteinlerinin hemaglutinasyon özelliği vardır. Vireminin kısa ve geçici, ayrıca semptomatik dönemde viral yükün düşük olması nedeniyle virus izolasyonu ve viral nükleik asitlerin saptanması olumsuz olarak etkilenmektedir.

Viral nükleik asitlerin saptanmasında viral genomun farklı segmentlerini hedef alan primer/prob setleri kullanılarak RT-PCR, nested-RT-PCR ve diğer viral meningoensefalit etkenlerinin bazılarını hedef alan multipleks PCR yöntemleri uygulanmaktadır. Nested-PCR, hücre kültürü ve immüno Floresans yöntemiyle IgM saptanmasından daha duyarlıdır ancak semptomlar başladıktan sonra 2-5 gün içinde negatifleşir. Enterovirus ve TOSV'yi aynı örnekte tek reaksiyonda saptayabilen multipleks PCR'in diğer moleküler yöntemlere benzer duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. PCR protokollerinde çoğunlukla viral nükleokapsidi kodlayan S segmenti hedef alınmaktadır. Ancak bu yöntemin bazı viral varyantları ve bölgesel izolatları saptamakta yetersiz kalabileceği, korunmuş diğer bir bölge olan L segmentine ait primerlerin bu dezavantajı ortadan kaldıracabileceği söylenmektedir (166, 187-189).

TOSV enfeksiyonu tanısında moleküler yöntemlerin kullanımı ya da virusun izolasyonu açısından kritik nokta, kısa süreli viremi ve düşük virus yükü nedeniyle erken semptomatik dönemde uygun örneğin alınmasıdır (166, 188).

TOSV'ye karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarının gösterilmesinde immünofloresans, ELISA, kompleman birleşmesi, hemagglütinasyon inhibisyon, PRNT gibi yöntemler kullanılmaktadır. ELISA yönteminin PRNT ve hemagglütinasyon inhibisyon testinden daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Akut enfeksiyonun tanısında PCR yaklaşımları ile birlikte IgM ve intratekal IgG üretiminin gösterilmesi yöntemleri uygulanmaktadır (166, 190, 191).

2.3.6 Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

Phlebovirus cinsine ait viruslar hem omurgalıları hem artropodları enfekte etme özelliğine sahiptir. Fleboviruslardan kum sineği ateşi etkeni olan virusları taşıyan vektörler *Psychodidae* ailesinde incelenmektedir. Eski dünyada kum sineği ateşi etkeni olan viruslar için vektör *Phlebotomus* cinsi tatarcıklardır. SFSV ve SFNV, eski dünyada en yaygın görülen kum sineği ateşi etkenleridir. Grip benzeri, kendi kendini sınırlayan ateşli bir hastalık oluşturan bu viruslar Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Balkanlar, Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya'da enfeksiyonlara neden olmuştur ancak vektör eradikasyon programlarının sonucu olarak özellikle Avrupa'da son 40 yılda olgu sayısında ciddi azalma izlenmiş veya tamamen ortadan kalkmıştır. Ancak TOSV, Akdeniz ülkelerinde kum sineği ateşi etkeni olarak varlığını sürdürmektedir. SFSV ve SFNV için vektör *Phlebotomus papatasi*, TOSV için vektörler ise *Phlebotomus perniciosus* ve *Phlebotomus perfiliewi*dir. TOSV, vektörlerden ve vektörlerin bulunduğu bölgelerde yarasa (*Pipistrellus kuhli*) beyinlerinden izole edilebilmektedir. Virus vektörde viral persistan bir enfeksiyon oluşturur, ayrıca vektördeki transovaryal, transstadyal ve veneral geçiş, virusun amplifikasyonunda önemli rol oynar. Çalışmalar TOSV için bir havyan rezervuarının söz konusu olabileceğini göstermiş olmakla birlikte, doğada rezervuar rolü oynayan türler henüz kesinlik kazanmamıştır.

TOSV enfeksiyonlarında bulaşma, virusu taşıyan vektörlerin ısırması ile meydana gelmektedir. Enfeksiyon çoğu kez vektörlerin aktif olduğu ilkbahar sonu, yaz ve sonbahar başında sıklaşmakta; menenjit olguları yaz ayları boyunca görülmekte ve olgu sayısındaki artış ağustos ayında zirveye ulaşmaktadır. Erişkinlerde daha sık olmakla birlikte pediatrik yaş grubunda da enfeksiyon izlenebilmektedir (166, 190, 192).

TOSV epidemiyolojisi ile ilgili ayrıntılı verilerin büyük çoğu İtalya'dan gelmekte ve özellikle Güney İtalya'da virusun önemli bir aseptik menenjit etkeni olduğu gösterilmektedir. Benzer şekilde İspanya'da da virus aktivitesinin bulunduğu ve bunun sadece Akdeniz'e kıyısı olan kesimlerle sınırlı olmadığı tespit edilmiştir. Virusun varlığına ait veriler Fransa, Cezayir, Portekiz, Yunanistan ve Kıbrıs'tan da gelmektedir. Virus aktivitesinin izlendiği bölgelerin bir kısmında sağlıklı kişilerde de değişik oranlarda seropozitifliğin saptanması, semptomatik ya da asemptomatik enfeksiyonun vektörlerin bulunduğunu tüm Akdeniz ülkelerinde yaygın olabileceğini düşündürmektedir (193-198).

2.3.7 Türkiye'deki Durum

Ülkemizde, *Phlebotomus* cinsi içerisinde *Adlerius*, *Larroussius*, *Paraphlebotomus* ve *Phlebotomus* altcinslerine ait türler bulunmaktadır. Özellikle layşmanyazisin ve tatarcık ateşinin taşınması açısından önemli olan bu kum sineği türleri Akdeniz, Ege, Marmara, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaygındır (199). Bu bölgelerde, endemik veya sporadik olarak görülen Kala-azar ve şark çıbanına vektörlük yapan bu sinekler üzerine, ülkemizde 1940 yılında başlayan ve bugüne kadar sürdürülen çalışmalarla toplam 18 türün varlığı bildirilmiştir (200-206). Ülkemizdeki flebovirus aktivitesine dair ilk çalışma 1955 yılında Antalya'da sağlıklı kişilerden toplanan 50 serum örneği ile gerçekleştirilmiş ve 1976'da yayınlanan bu çalışmada PRNT ile doğrulama sonrası SFSV ve SFNV seroprevalansları sırasıyla %22 ve %62 olarak bildirilmiştir (160). 1980 yılında yayınlanan ve Ege bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada ise Nisan-Eylül 1974'de sağlıklı kişilerden toplanan 1074

serum örneği HI testi ile incelenmiş, SFSV ve SFNV seroprevalansları sırasıyla %0.84 ve %13.9 olarak bildirilmiştir (72). Her iki çalışmada da TOSV'ye ait herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Türkiye'deki TOSV aktivitesini gösteren ilk rapor 2003 yılına aittir. Bu çalışmada, Ege bölgesinde Aydın ili Akbük ve Olukbaşı beldelerinin sakinlerinin SFNV ve TOSV maruziyeti ortaya konulmuş, TOSV ve SFNV seroprevalansları sırasıyla %55 ve %17.5 olarak bildirilmiş ancak akut hastalık ya da vektörde virus gösterilememiştir (207). Akut TOSV'a bağlı MSS enfeksiyonlarına ait ilk bildirim ise 2010 yılında Ankara ilinden yapılmıştır. Ocak-Nisan 2009 tarihleri arasında, Ankara, Konya, Eskişehir ve Zonguldak'tan 1533 sağlıklı kan donörü serum örnekleri IIFT ile çalışılmış, virus nötralizasyon testi (VNT) ile doğrulama sonrası %14.7 oranında nötralizan antikorlar saptanmış, incelenen tüm illerde TOSV maruziyeti gösterilmiştir. Aynı çalışmada 102 meningoensefalit ön tanılı hastadan alınan serum örnekleri IIFT ve RT-PCR ile çalışılmış ve 16 hastada TOSV RNA saptanmış, olguların 4'ünde TOSV IgM antikorları gösterilmiştir. Elde edilen L ve S bölgesi kısmi dizilerine göre ülkemizde dolaşan TOSV izolatının TOSV genotip A'ya yakın olduğu gösterilmiştir (172). Bir sonraki yıl İzmir ve Ankara'da, 125 hastayı kapsayan bir çalışmada 12 serum örneği ve 1 BOS örneğinde TOSV IgM saptanmıştır (82). Bir başka serosürveyans çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Bankası'nda elde edilen 1115 sağlıklı kan donörü serum örnekleri TOSV açısından araştırılmış, IIFT ile 199 örnekte anti-TOSV antikorları saptanmış, VNT ile 42 örnekte anti-TOSV IgG, 17 örnekte anti-TOSV IgM antikor varlığı doğrulanmıştır (208). Kan örneklerinin sahiplerinin yaşadığı bölgeler incelendiğinde, İç Anadolu, Karadeniz, Akdeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde flebovirusların insanları enfekte ettiği gösterilmiştir. Ayrıca TOSV maruziyetinin yaş ile artış gösterdiği saptanmış, erkek cinsiyet, dış ortamda çalışma, kırsal alanda ikamet etme ve çevrede sık olarak sivrisinek/kum sineği izlenmesi, virusa maruziyet açısından risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Trakya'nın doğusunda, 2012 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, sağlıklı kan

donörlerinde %14.4 oranında nötralizan antikorlar saptanmış ve bu bölgede de TOSV maruziyeti doğrulanmıştır (209).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İncelenen Olgular ve Örnekler

Araştırmaya, Mayıs 2012 - Mart 2013 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anadilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Birimi tarafından viral menenjit/ensefalit ya da nedeni bilinmeyen ateş ön tanısı ile izlenen 94 olgu dahil edilmiştir. Araştırmaya dahil edilen olgular, bakteri ve mantar kültürlerinde üreme olmayan, hızlı antijen testleri ve herpes simpleks tip 1-2 virusları için uygulanan PCR sonucu negatif bulunan ve etiyolojinin açıklanması amacıyla beyin omurilik sıvısı (BOS) ve/veya kan örnekleme yapılan hastalardır.

Araştırmanın amaç ve içeriği ile ilgili olarak hazırlanan detaylı rapor, "Etik Kurul Başvuru Dosyası" halinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na sunulmuş, 03.05.2012 tarih ve FON 12/05-5 karar numarası ile onay alınmıştır. Tüm olgular ya da yakınlarından, ilgili kurumsal etik kurul onayında açıklandığı şekilde (Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Rapor No. FON:12/05-5), Aydınlatılmış Onam Formu okunarak bilgilendirme yapılmış ve onay alınmıştır.

3.2. Klinik Örneklerin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Olgulardan alınan toplam 104 kan ve 94 BOS örneği araştırmaya dahil edilmiştir. Kan örnekleri 10 dakika 4000x g'de santrifüj edilmiş (Hettich Mikro12-24, Almanya) ve serumları ayrılmıştır. BOS ve elde edilen serum örnekleri alikotlanıp, steril pipet uçları kullanılarak 500'er µl'lik miktarlarda steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve çalışma gününe kadar - 80°C'lik derin dondurucuda (UltraLow Freezer, NuAire, ABD) saklanmıştır.

3.3. RNA Saflaştırılması

Serum ve BOS örneklerinde RNA saflaştırma işlemleri, ticari bir spin kolon nükleik asit ekstraksiyon kiti olan (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche Diagnostics, Almanya) ile üretici talimatları doğrultusunda aşağıda tariflendiği şekilde yapılmıştır.

1. 200 µl hacmindeki hasta örnekleri nükleaz içermeyen tüplere aktarıldı ve üzerine proteinaz K ve poli (A) taşıyıcı RNA içeren 200 µl bağlanma solüsyonu ("Binding Buffer", BB) eklenerek vorteks ile karışması sağlandı.
2. Karışım 72°C'deki ısı bloğunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrasında tüpler spin santrifüj edildi ve takiben tüplere 100 µl BB eklenerek 12.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
4. Tüplere 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon ("Inhibitor Removal Buffer", IRB) eklenerek 12.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
5. Ardından 450 µl yıkama solüsyonu ("Wash Buffer", WB) eklenerek örnekler yıkandı ve aynı işlem bir kez daha tekrar edildi.
6. Yıkama işleminin ardından tüplere ısı bloğunda ısıtılmış, 50 µl ayrıştırma solüsyonu ("Elution Buffer", EB) eklenerek 12.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
7. Elde edilen nükleik asitler 6 saat içinde komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemine alındı ve iki işlem arasında +4°C'de saklandı.

3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, ticari bir sistem olan (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Japonya) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda, homojenizasyon ve nükleik asit saflaştırılması sonucunda elde edilen total RNA kullanılarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. 6 µl total RNA ile 1 µl randomize heksamer primerler (100 µM, 0.5 µg/µl) buz üzerinde karıştırıldı ve üzerine 6 µl nükleaz içermeyen su eklendi.
2. Elde edilen karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında buz üzerine alınan karışıma 4 µl 5x reaksiyon solüsyonu ("Reaction Buffer", RB), 2 µl 10mM dNTP karışımı (deoksi adenin, guanin, sitozin ve timin trifosfat içeren) ve 1 µl "M-MuLV Reverse Transcriptase" enziminden (200 U/µl) eklendi.

4. Karışım 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika inkübe edildi ve 5 dakika 70°C'de ısıtma ile reaksiyon sonlandırıldı.
5. cDNA sentezi sonrası PCR işlemine alınacak örnekler +4°C'de, bekleyecek örnekler ise -20°C'de saklandı.

3.5. Klinik Örneklerde BNV Araştırılması

3.5.1. BNV RNA'sının Saptanması

BOS ve serum örneklerinde BNV RNA'sının saptanması amacıyla viral zarf glikoproteinlerini hedefleyen, iki turlu "nested" PCR protokolü uygulanmıştır (210). Bu amaçla örnek başına 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP ve her bir primerden 10 pmol içerecek şekilde nükleaz içermeyen 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerinde PCR karışımı hazırlanmıştır (Tablo 3.1). Örnek sayısına göre hazırlanan karışım, vorteks cihazında hafifçe karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı, steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra üstlerine 3'er µl cDNA örneği konulup ısı döngü cihazına (Techne® TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir.

PCR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı karışım içeriği ve sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2). İkinci tur PCR karışımında nükleaz içermeyen su 20.3 µl'ye çıkarılmış, ikinci tur primerleri ve ilk turdan 1 µl örnek ile amplifikasyona alınmıştır.

Tablo 3.1: İki turlu BNV PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Viral Genomdaki Yerleşimleri

	Primer Dizisi	Yerleşim
1. Tur	5' - ACC ACC TAC TGT GGA GTC- 3'	(1401-1419 nt)
	5' - TTC CAT CTT CAC TCT ACA CT - 3'	(1845-1825 nt)
2. Tur	5' - GCC TTC ATA CAC ACT AAA - 3'	(1485-1504 nt)
	5' - CCA ATG CTA TCA CAG ACT - 3'	(1732-1713 nt)

Tablo 3.2: BNV PCR için Karışım İçeriği ve Reaksiyon Koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	3 µl	94°C' de 5 dakika 94°C' de 30 saniye 55°C' de 1 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 10 dakika
MgCl₂	2 µl	
DNTP	1 µl	
Primer1	1 µl	
Primer2	1 µl	
Taq Polimeraz	0.3 µl	
DdH₂O	18.3 µl	
Kalıp DNA	3 µl	
Toplam	30 µl	

40
döngü

PCR ürünlerin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 0.8 gr agaroz 40 ml 1X Tris asetat-EDTA (TAE) [50x TAE: 242 gr Tris baz + 57.1 ml asetik asit + 100 ml 0.5M EDTA (pH: 8) + 600 ml distile su → pH 7.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 50 kat sulandırılarak kullanılmıştır] solüsyonu ile karıştırılıp mikrodalga fırında (Arçelik MD551, Türkiye) homojen hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dökülmeden önce 2 µl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenmiş, jel katılaşmaya kadar oda ısısında bekletilmiş; daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir. PCR işlemi tamamlanarak 4°C'de bekletilen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 1 µl yükleme tamponu (100 mg Orange G + 55 ml gliserol + 45 ml 1x TAE ile hazırlanmış

stok solüsyondan) ile iyice karıştırılmıştır. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra örnekler 100 Volt'luk doğru akımda (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 40 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel görüntüleme cihazında (Biospectrum 500 Imaging System, İngiltere) ultraviyole ışık altında incelenmiştir. İkinci tur sonucu beklenen yaklaşık 248 nükleotidlik ampikonların izlendiği örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. PCR işlemlerinde pozitif kontrol olarak BNV NY99-4132 suşu ile inoküle edilmiş Vero hücre kültürü süpernatantları kullanılmıştır.

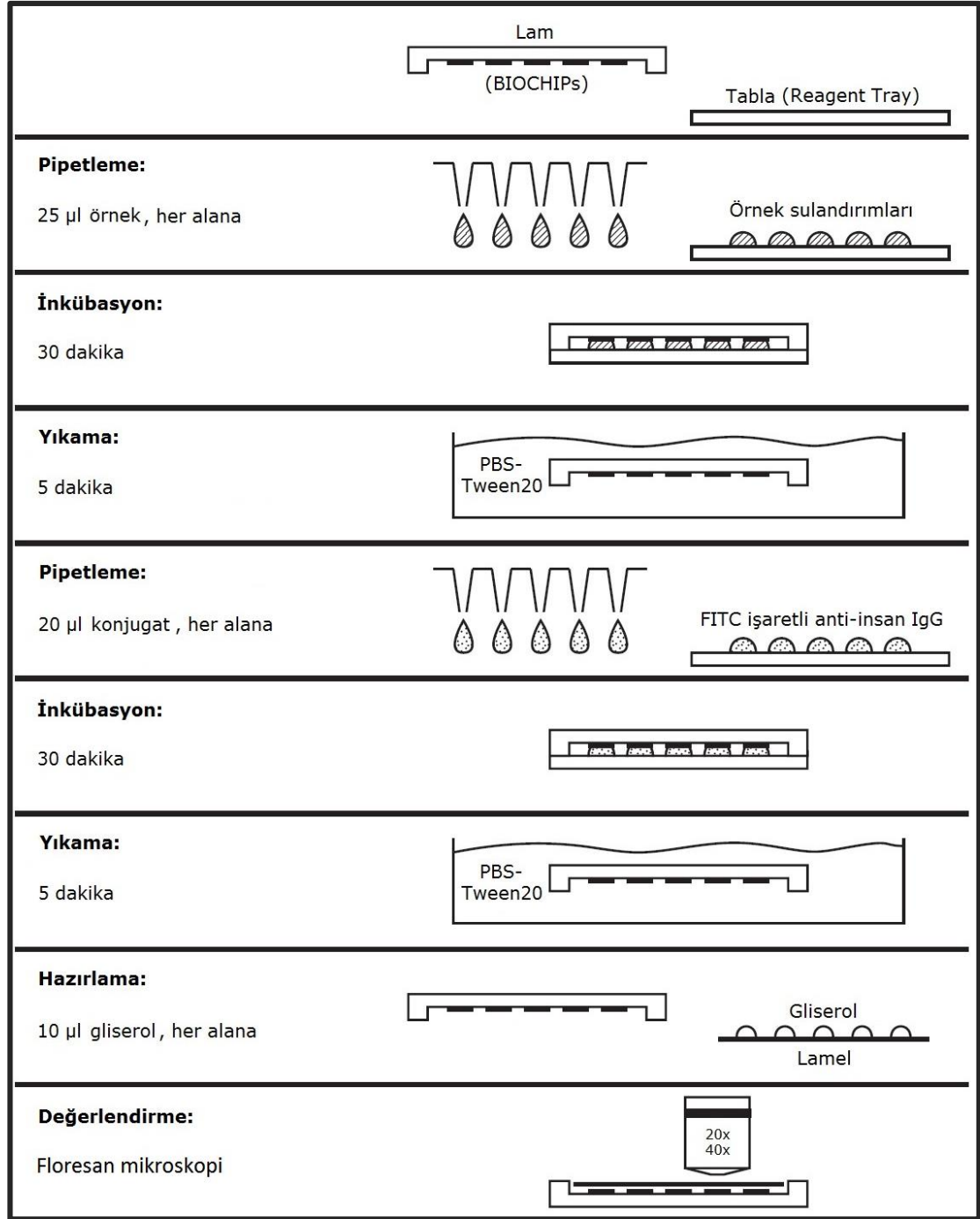
3.5.2. BNV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması

BOS ve serum örnekleri BNV IgM ve IgG tipi antikorlar açısından IIFT yöntemi ile ticari bir kit (Anti-West Nile Virus IIFT, Euroimmun, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır.

Araştırmada, BNV IgM ve IgG IIFT testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda firma tarafından temin edilen 10 gözlü özel tablalar ("Reagent tray") ve BNV ile enfekte hücrelerin kaplandığı 10 gözlü özel lamalar ("Biochip slide") kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.1):

1. Hasta örnekleri, kit içinde hazır olarak bulunan tampon solüsyonu (TS) ile belirli oranlarda dilüe edilerek çalışıldı.
 - a. IgG için serum örnekleri 1:100 oranında, BOS örnekleri 1:2 oranında TS ile dilüe edildi.
 - b. IgM testlerinde interferensin engellenmesi için, serum örnekleri 1:10 oranında, BOS örnekleri ise 1:2 oranında üretici firma tarafından sağlanan IgG-romatoid faktör absorbanı (EUROSORB) ile dilüe edildi. Örnek dilüsyonları 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellet kısmına temas etmeden süpernatant ile çalışıldı.
2. Tablalar üzerindeki her bir alana sırasıyla; pozitif kontrol, negatif kontrol ve dilüe edilmiş hasta BOS ve serumları otomatik pipet yardımıyla 25'er µl damlatıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.

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



Şekil 3.1: IIFT Yönteminin Uygulanması

(<http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/Cat2010EN.pdf>
'den uyarlanmıştır)

3.6. Klinik Örneklerde KKEV Araştırılması

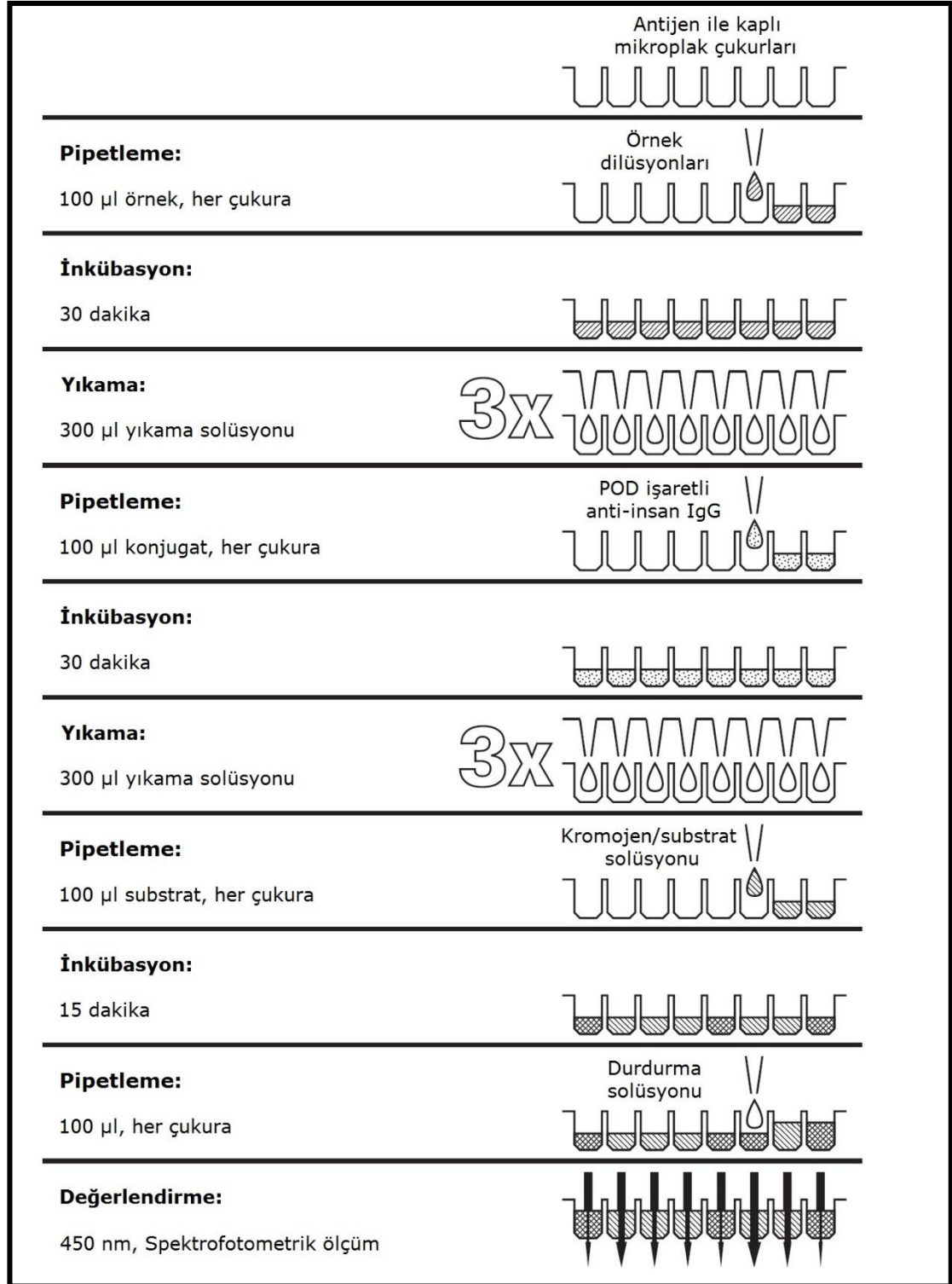
3.6.1. KKEV Antikorlarının ELISA Yöntemi ile Saptanması

BOS ve serum örnekleri KKEV IgM ve IgG tipi antikorlar açısından ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla ticari bir ELISA kiti (Anti-TBE Virus ELISA, Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır.

Araştırmada, KKEV IgM ve IgG ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda 96 çukurlu mikrolaklar kullanılarak, aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.2):

1. Hasta örnekleri kit içerisinde hazır olarak bulunan tampon solüsyonu ile 1:100 oranında dilüe edilerek çalışıldı.
2. Mikrolak çukurlarına sırasıyla; kalibratörler, kontroller ve dilüe edilmiş BOS veya serum örneklerinden otomatik pipet yardımıyla 100'er µl eklendi. Üretici tarafından, kantitatif değerlendirme yapılmasına olanak sağlayan farklı KKEV antikor konsantrasyonlarında üç adet kalibratör [Kalibratör 1 (200 RU/ml), Kalibratör 2 (20 RU/ml), Kalibratör 3 (2 RU/ml)] ve testin kalite kontrolünün sağlanması için pozitif ve negatif kontroller sağlanmıştır.
3. Mikrolakların üzeri koruyucu folyo ile kapatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Yıkama tampon solüsyonu (10X konsantrasyonda), 9 birim distile suya 1 birim olacak şekilde eklenerek sulandırıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.
5. İnkübasyon sonunda mikrolak çukurları, yıkama tampon solüsyonuyla 3'er kez otomatik sistemde (ASYS Atlantis Washer, Euroimmun, Almanya) yıkandı.
6. Tüm çukurların üzerine 100'er µl peroksidaz (POD) enzimi ile işaretli anti-insan IgG solüsyonu (konjugat) eklendi ve mikrolağın üzeri koruyucu folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda mikrolak çukurları, yıkama tampon solüsyonuyla 3'er kez otomatik sistemde yıkandı.

8. Tüm çukurlara 100'er µl kromojen-substrat solüsyonu [tetra-methylbenzidine (TMB)/H₂O₂] eklendi.
9. Mikroplak gün ışığı ile temas etmeyecek şekilde 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha sonra her bir çukura 100'er µl durdurma (stop) solüsyonu (0.5 M sülfürik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. Reaksiyonun sonlandırılmasından 10 dakika içinde, çukurlardaki renk değişiminin absorbans değerleri, referans dalga boyu 600-650 nm olmak üzere 450 nm'de spektrofotometrik olarak okutuldu.
11. Değerlendirmede, standartlara (Kalibratör 1, 2 ve 3) ait absorbans değerleri (optik dansite, OD) kullanılarak bilgisayar destekli (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, UK) bir grafik elde edildi. Oluşan grafiğe göre örneklerin antikor konsantrasyonları, mililitre başına relatif ünite (RU/ml) olacak şekilde kantitatif olarak belirlendi. Buna göre; antikor değeri ≥ 20 RU/ml olarak bulunan örnekler pozitif, 15-19 RU/ml arasında bulunanlar şüpheli pozitif ("borderline"), < 15 RU/ml bulunanlar ise negatif olarak kabul edildi.



Şekil 3.2: ELISA Yönteminin Uygulanması

(<http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/Cat2010EN.pdf>
'den uyarlanmıştır)

3.6.2. KKEV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması

ELISA ile KKEV IgM ve IgG tipi antikorlar açısından pozitif bulunan örnekler IIFT yöntemi ile tekrar çalışılmıştır. Bu amaçla ticari bir IIFT kiti (Anti-TBE Virus IIFT, Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır.

Araştırmada, KKEV IgM ve IgG IIFT testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda firma tarafından temin edilen 10 gözlü özel tablalar ve KKEV ile enfekte hücrelerin kaplandığı 10 gözlü özel lamalar kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.1):

1. Hasta örnekleri, kit içinde hazır olarak bulunan TS ile belirli oranlarda dilüe edilerek çalışıldı.
 - a. IgG için serum örnekleri 1:100 oranında, BOS örnekleri 1:2 oranında TS ile dilüe edildi.
 - b. IgM testlerinde interferensin engellenmesi için, serum örnekleri 1:10 oranında, BOS örnekleri ise 1:2 oranında üretici firma tarafından sağlanan IgG-romatoid faktör absorbanı (EUROSORB) ile dilüe edildi. Örnek dilüsyonları 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellet kısmına temas etmeden süpernatant ile çalışıldı.
2. Tablalar üzerindeki her bir alana sırasıyla; pozitif kontrol, negatif kontrol ve dilüe edilmiş hasta BOS ve serumları otomatik pipet yardımıyla 25'er µl damlatıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
3. Özel 10 gözlü lamalar, serum örneklerine tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi ve 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi.
4. Yıkama işleminde kullanılmak üzere PBS-T solüsyonu hazırlandı. Bunun için kit içinde toz halinde bulunan PBS paketinin tamamı 1 L distile su içinde çözüldü ve yine kit içinde bulunan 2 ml Tween-20 eklenerek karıştırıldı.

5. İnkübasyon sonunda lamalar, tablalar üzerinden alındı ve üzerlerinden hızlıca PBS-T solüsyonu geçirilerek yıkandı. Daha sonra içerisinde PBS-T solüsyonu olan küvet içine yerleştirilerek en az beş dakika bekletildi.
6. Temiz bir tabla üzerindeki her bir göze konjugat solüsyonundan 20'şer µl otomatik pipet yardımıyla damlatıldı.
7. Yıkama işlemi tamamlanmış lamalar, fazla sıvılarından arındırılarak konjugat ile tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi. Işıktan korunarak, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Yıkama işlemi yukarıdaki şekilde (Madde 5) tekrarlandı.
9. Lamellerin üzerine, her alana birer damla (10 µl) olmak üzere kit içinde bulunan gliserolden damlatıldı. Daha sonra yıkama işlemi tamamlanmış ve fazla sıvılarından arındırılmış lamalar, bu lamellerin üzerine kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi.

Değerlendirme, floresan mikroskopta 20X ve 40X büyütmede, KKEV ile enfekte hücrelerin sitoplazmasında, özgül antijen-antikör birleşmesini ifade eden parlak yeşil renkli floresans veren küçük granüler yapıların görülmesiyle yapıldı. Örneklerde saptanan floresansın şiddeti; pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak zayıf (+), orta (++) veya güçlü (+++) pozitif şeklinde yorumlandı.

3.7. Klinik Örneklerde TOSV Araştırılması

3.7.1. TOSV RNA'sının Saptanması

Hasta örneklerinde TOSV ve diğer flebovirusların saptanması amacıyla, flebovirus cinsinin tüm üyelerini amplifiye edebilme özelliğine sahip, virusun L genomik segmentinde yer alan RNA polimeraz genini hedefleyen bir Pan-Flebovirus PCR yaklaşımı uygulanmıştır (187). Bu amaçla örnek başına 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP ve her bir primerden 10 pmol içerecek şekilde nükleaz içermeyen 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerinde PCR karışımı hazırlanmıştır (Tablo 3.3). Örnek sayısına göre hazırlanan karışım, vorteks cihazında hafifçe karıştırılıp 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı, steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 27 µl olacak şekilde

paylaştırılmıştır. Daha sonra üstlerine 3'er µl cDNA örneği konulup ısı döngü cihazına (Techne® TC-3000, Techne Inc., ABD) yerleştirilmiştir.

PCR protokolünün birinci ve ikinci turları aynı karışım içeriği ve sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). İkinci tur PCR karışımında nükleaz içermeyen su 20.3 µl'ye çıkarılmış, ikinci tur primerleri ve ilk turdan 1 µl örnek ile amplifikasyona alınmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.3: Pan-Flebovirus PCR Karışım İçeriği ve Reaksiyon Koşulları

Bileşenler		Koşullar
10X Tampon	3 µl	95°C' de 5 dakika 95°C' de 30 saniye 44°C' de 1 dakika 72°C' de 1 dakika 72°C' de 3 dakika
MgCl₂	2 µl	
DNTP	1 µl	
Primer1	1 µl	
Primer2	1 µl	
Taq Polimeraz	0.3 µl	
ddH₂O	18.3 µl	
Kalıp DNA	3 µl	
Toplam	30 µl	

Tablo 3.4: Pan-Flebovirus PCR için Kullanılan Primer Dizileri ve Viral Genomdaki Yerleşimleri

Primer Dizisi		Yerleşim
1. Tur	5' - ATGGARGGITTTGTIWSICIICC - 3'	(2047-2069 nt)
	5' - AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC - 3'	(2600-2575 nt)
2. Tur	5' - WTICCIAAICCIYMSAARATG - 3'	(2074-2094 nt)
	5' - TCYTCYTTTRTTYTTRARRTARCC - 3'	(2318-2296 nt)

I: İnozin, Y: C/T, R: A/G, W: G/C, M: A/C

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 0.8 gr agaroz 40 ml 1X TAE solüsyonu ile karıştırılıp mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Tarakların yerleştirildiği jel tepsinine dökülmeden önce 2 µl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenmiştir. Jel katılaşmaya kadar oda ısısında bekletilmiş, daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir. PCR işlemi tamamlanarak 4°C'de bekletilen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 1 µl yükleme tamponu (100 mg Orange G + 55 ml gliserol + 45 ml 1x TAE ile hazırlanmış stok solüsyondan) ile iyice karıştırılmıştır. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra örnekler 100 Volt'luk doğru akımda (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel görüntüleme cihazında (Biospectrum 500 Imaging System, İngiltere), ultraviyole ışık altında incelenmiştir. İkinci tur sonucu beklenen yaklaşık 244 nükleotidlik ampikonların izlendiği örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Araştırmada pozitif kontrol olarak standart TOSV izolatı ISS.PhI.3 suşu ile inoküle edilmiş Vero hücre kültürü süpernatantları kullanılmıştır.

3.7.2. TOSV Antikorlarının IIFT Yöntemi ile Saptanması

BOS ve serum örnekleri TOSV IgM ve IgG tipi antikorlar açısından IIFT yöntemi ile ticari bir kit (Anti-Sandfly Fever Virus IIFT type Toscana, Euroimmun, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır.

Araştırmada, TOSV IgM ve IgG IIFT testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda firma tarafından temin edilen 10 gözlü özel tablalar ve TOSV ile enfekte hücrelerin kaplandığı 10 gözlü özel lamalar kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.1):

1. Hasta örnekleri, kit içinde hazır olarak bulunan TS ile belirli oranlarda dilüe edilerek çalışıldı.
 - a. IgG için serum örnekleri 1:100 oranında, BOS örnekleri 1:2 oranında TS ile dilüe edildi.
 - b. IgM testlerinde interferensin engellenmesi için, serum örnekleri 1:10 oranında, BOS örnekleri ise 1:2 oranında üretici firma tarafından sağlanan IgG-romatoid faktör absorbanı (EUROSORB) ile dilüe edildi. Örnek dilüsyonları 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellet kısmına temas etmeden süpernatant ile çalışıldı.
2. Tablalar üzerindeki her bir alana sırasıyla; pozitif kontrol, negatif kontrol ve dilüe edilmiş hasta BOS ve serumları otomatik pipet yardımıyla 25'er µl damlatıldı. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
3. Özel 10 gözlü lamalar, serum örneklerine tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi ve 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi.
4. Yıkama işleminde kullanılmak üzere PBS-T solüsyonu hazırlandı. Bunun için kit içinde toz halinde bulunan PBS paketinin tamamı 1 L distile su içinde çözüldü ve yine kit içinde bulunan 2 ml Tween-20 eklenerek karıştırıldı.

5. İnkübasyon sonunda lamalar, tablalar üzerinden alındı ve üzerlerinden hızlıca PBS-T solüsyonu geçirilerek yıkandı. Daha sonra içerisinde PBS-T solüsyonu olan küvet içine yerleştirilerek en az beş dakika bekletildi.
6. Temiz bir tabla üzerindeki her bir göze konjugat solüsyonundan 20'şer µl otomatik pipet yardımıyla damlatıldı.
7. Yıkama işlemi tamamlanmış lamalar, fazla sıvılarından arındırılarak konjugat ile tamamen temas edecek şekilde tablalar üzerine yerleştirildi. Işıktan korunarak, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Yıkama işlemi yukarıdaki şekilde (Madde 5) tekrarlandı.
9. Lamellerin üzerine, her alana birer damla (10 µl) olmak üzere kit içinde bulunan gliserolden damlatıldı. Daha sonra yıkama işlemi tamamlanmış ve fazla sıvılarından arındırılmış lamalar, bu lamellerin üzerine kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi.

Değerlendirme, floresan mikroskopta 20X ve 40X büyütmede, TOSV ile enfekte hücrelerin sitoplazmasında, özgül antijen-antikor birleşmesini ifade eden parlak yeşil renkli floresans veren küçük granüler yapıların görülmesiyle yapıldı. Örneklerde saptanan floresansın şiddeti; pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak zayıf (+), orta (++) veya güçlü (+++) pozitif şekilde yorumlandı.

TOSV IgM ya da IgG tipi antikorlar açısından orta ya da güçlü pozitif bulunan örnekler, aynı serokomplekste bulunan diğer viruslarla çapraz reaksiyonu değerlendirmek için, TOSV'ye ek olarak "Sandfly Fever Naples virus (SFNV)", "Sandfly Fever Scilian virus (SFSV)" ve "Sandfly Fever Cyprus virus (SFCV)" antijenlerini de içeren ticari bir IIFT (Sandfly Fever Virus Mosaic 1 IIFT, Euroimmun, Almanya) yöntemiyle incelendi.

3.8. BNV ve TOSV Kısmi Dizilerinin Tanımlanması

BNV ve TOSV PCR'ları ile pozitif bulunan örnekler ait ampliconlar, DNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Bu amaçla PCR ürünleri "High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile temizlenmiş, ikinci tura ait "forward" ve "reverse" primerler ile dizi reaksiyonu uygulanmış, ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) sistemi ile değerlendirilmiştir. Dizilerin hizalanması ve filogenetik analizlerde Bioedit, CLC Main Workbench v5.2 (CLCBio, Danimarka) ve MEGA yazılımları kullanılmıştır (211).

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunda BNV Enfeksiyonları

4.1.1. BNV Nükleik Asit Saptanması Sonuçları

Çalışmada toplam 2 olguda (2/94, %2.1) viral RNA saptanmış ve olgular akut BNV enfeksiyonu olarak tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, Ankara ilinde yaşayan 63 yaşında erkek hastadır (Tablo 4.1; Olgu 1). Kronik böbrek yetmezliği bulunan hasta, Haziran 2012'de konfüzyon ve dezoryantasyon bulgularıyla acil servise başvurmuştur. BOS biyokimyasında artmış protein (217 mg/dL) izlenen olgunun, elektroensefalogram (EEG) incelemesinde yaygın yavaş dalgalar görülmüştür. Kraniyal manyetik rezonans görüntüleme (MRG) tetkikinde beyaz cevherde bilateral intansite artışıyla karakterize lezyonlar, korpus kallozum ve periventriküler alanlarda difüzyon kısıtlılığı rapor edilmiştir. Yatırılarak destekleyici tedavi ile 17 günlük takibi sonunda herhangi bir sekel izlenmeden taburcu edilen olguda, 2.gün alınan serum örneğinde BNV RNA saptanmıştır.

İkinci olgu ise Ankara ilinde yaşayan, 87 yaşında kadın hastadır (Tablo 4.1; Olgu 2). Mayıs 2012'de bilinç bulanıklığı, ekstremitelerde ve yüzde miyoklonik atım bulguları ile başvuran hastada, bir hafta öncesinde ateşli hastalık öyküsü bulunmaktadır. İlk laboratuvar incelemelerinde hiponatremi (Na: 116 mEq/L) ve artmış alanin ve aspartat aminotransferaz düzeyleri (ALT: 41 U/L, AST: 81 U/L) saptanan olgunun EEG'sinde yaygın yavaş dalgalar izlenmiş, MRG'de ise sağ dorsal talamik bölgede difüzyon kısıtlılığı saptanmıştır. Uygulanan antiepileptik ve destekleyici tedaviye rağmen, hastanın nörolojik durumunda düzelme olmamış; EEG'de paroksizmal lateralize epileptiform deşarjlar (PLED) ve MRG'de temporoparietal korteks, insula ve talamus bölgelerinde hiperintens lezyonlar, ayrıca sitotoksik ve vazojenik ödem ortaya çıkmıştır. Ensefalit ön tanısı ile lomber ponksiyon uygulanan hastada BOS'ta düşük glukoz düzeyi (24 mg/dl) saptanmış; ayrıca BOS ve serum örneğinin her ikisinde tekrarlayan testlerle BNV RNA'sı pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif örneklemenin ardından

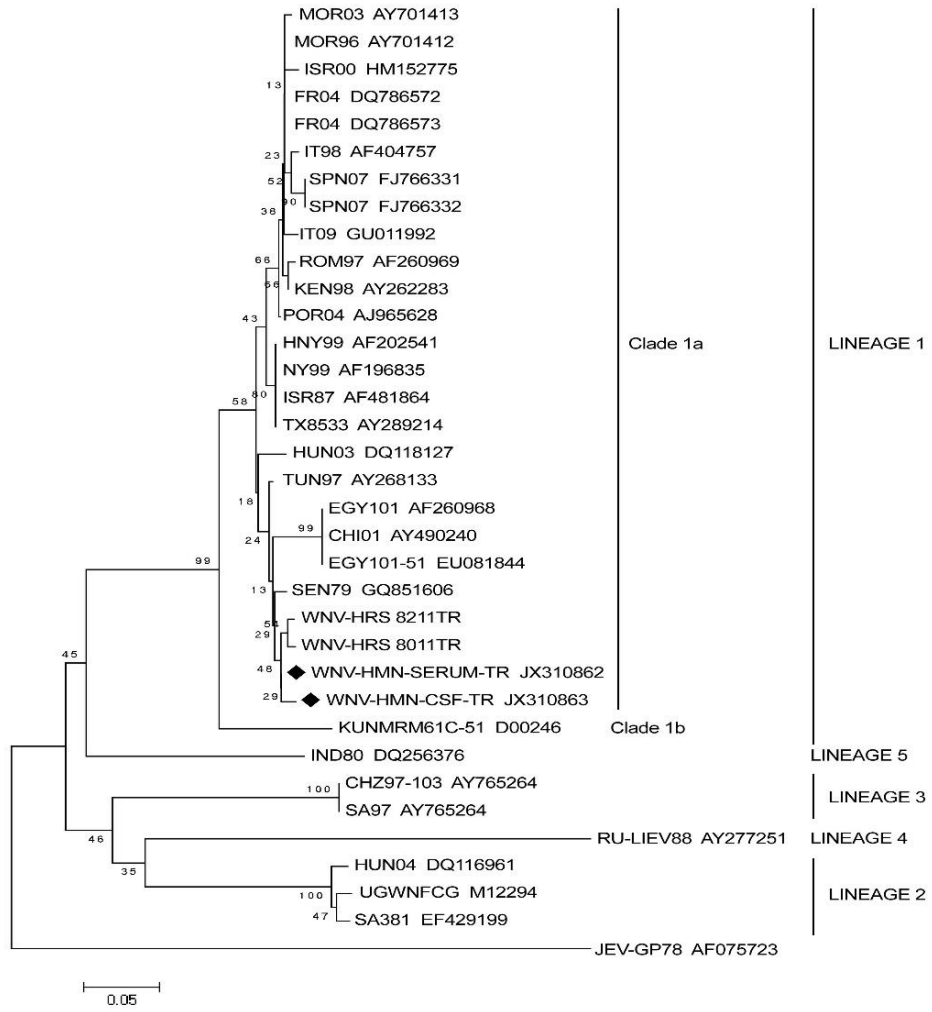
23 gün süresince alınan dört serum örneği BNV RNA ve özgül antikorlar için negatif olarak değerlendirilmiştir. Olgunun klinik takibinde nörolojik belirtilerinde düzelme, kontrol EEG ve MRG önceki lezyonlarda gerileme izlenmesine karşın, yatışının 10. haftasında nozokomiyal enfeksiyonlar nedeniyle eksitus olmuştur.

Tablo 4.1: BNV Enfeksiyonu Saptanan Olguların Özellikleri

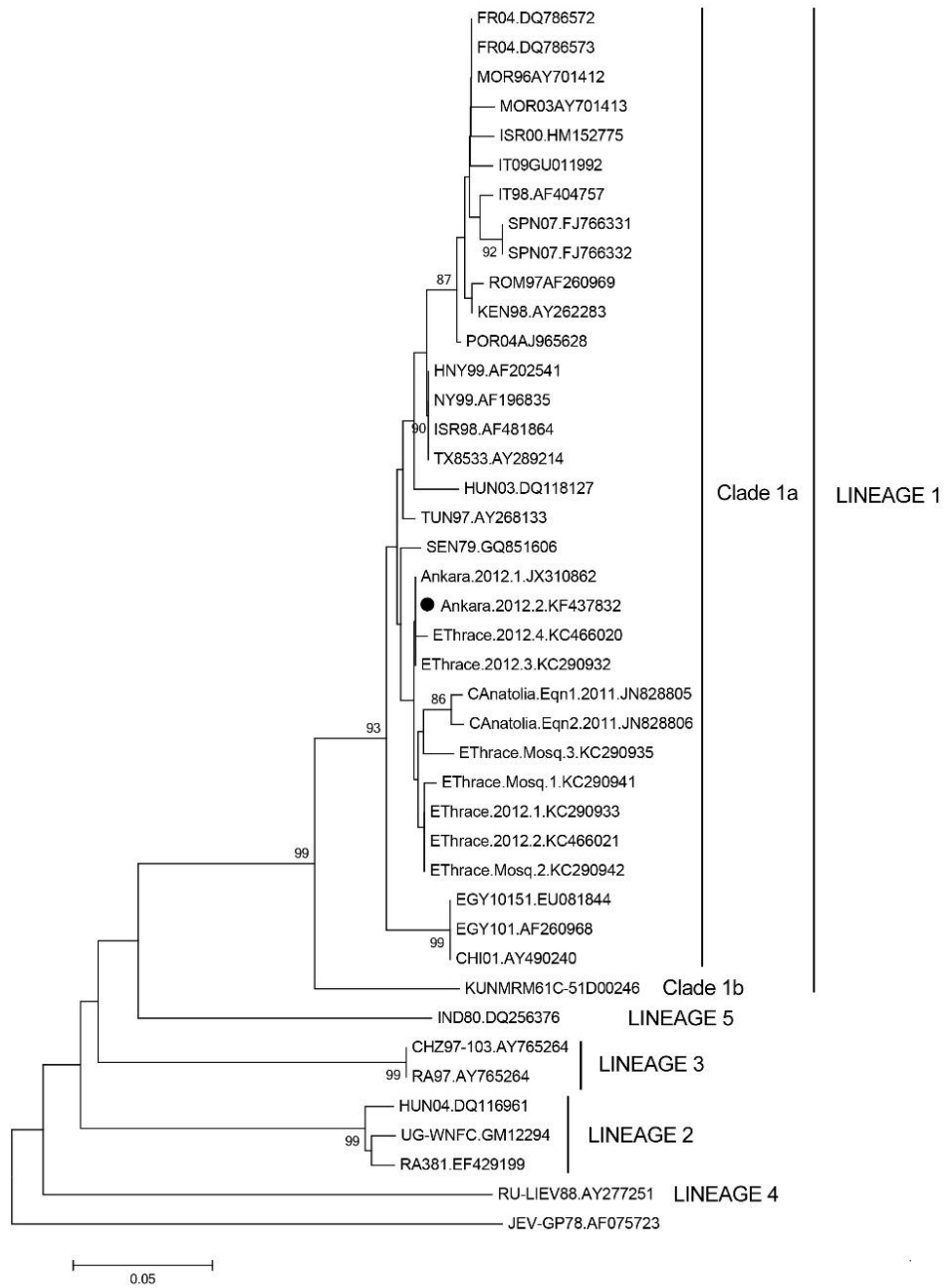
No.	Yaş/Cinsiyet	Yaşadığı Şehir	Belirti ve Bulgular	Laboratuvar Sonuçları	Tanısal Testler
1	87 / Kadın	Ankara	Ateşli hastalık sonrası bilinç bulanıklığı, Ekstremitelerde miyoklonik atımlar	Artmış ALT ve AST	Serumda BNV RNA (JX310862), BOS'ta BNV RNA (JX310863)
2	63 / Erkek	Ankara	Konfüzyon, Oryantasyon kaybı	BOS'ta artmış protein	Serumda BNV RNA (KF437832)

ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz

Her iki olguda BNV "nested" PCR ikinci turu ampikonlarının dizi analizi, enfeksiyon oluşturan virusların BNV köken 1 grup 1a izolatlarına benzerliğini ortaya koymuştur (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Çalışmada elde edilen diziler GenBank'a gönderilerek ulaşım kodu alınmıştır ([JX310862](#), [JX310863](#) ve [KF437832](#)).



Şekil 4.1: 1 Numaralı BNV Olgusunda (Tablo 4.1) Serum ve BOS Örneklerinde Saptanan Kısmi BNV Dizilerinin Analizi. Filogenetik ağaç "Neighbor-Joining" yöntemi ve MEGA v.5 yazılımı (www.megasoftware.net) ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 500 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan BNV dizileri için izolat isimleri ve GenBank ulaşım kodları belirtilmiştir. Japon ensefaliti virusu (JEV) izolatı GP78'e ait dizi "outlier" olarak analize eklenmiştir. (◆: Çalışmada elde edilen diziler).



Şekil 4.2: 2 Numaralı BNV Olgusunda (Tablo 4.1) Serum Örneğinde Saptanan Kısmi BNV Dizilerinin Analizi. Filogenetik ağaç "Neighbor-Joining" yöntemi ve MEGA v.5 yazılımı (www.megasoftware.net) ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 500 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan BNV dizileri için izolat isimleri ve GenBank ulaşım kodları belirtilmiştir. Japon ensefaliti virusu (JEV) izolat GP78'ye ait dizi "outlier" olarak analize eklenmiştir. (●: Çalışmada elde edilen dizi).

4.1.2. BNV Antikor Sonuçları

IIFT yöntemi ile yapılan değerlendirmede 9 olguda (9/94, %9.6) serum örneğinde pozitiflik izlenmiş, bunların 4'ünde IgM, 5'inde IgG seroreaktivitesi saptanmıştır. Tüm örneklerle eşlik eden BOS örnekleri ise BNV antikorları açısından negatif olarak bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: İncelenen Olgularda BNV Serolojik Test Sonuçları

BNV	IIFT	
	Zayıf Pozitif (+)	Orta/Güçlü Pozitif (++/+++)
IgG	0/94 (%0)	5/94 (%5.3)
IgM	0/94 (%0)	4/94 (%4.3)
IgG + IgM	0/94 (%0)	0/94 (%0)
Toplam	9/94 (%9.6)	

4.2. Çalışma Grubunda KKEV Enfeksiyonları

4.2.1. KKEV Antikor Sonuçları

ELISA yöntemi ile toplamda 12 olguda (12/94, %12.7), birisinde IgG de eşlik etmek üzere IgM tipi KKEV antikorları saptanmıştır. Tüm örneklerle ait BOS örneklerinde IgM ya da IgG antikorları negatif olarak izlenmiştir.

ELISA yöntemi ile orta veya güçlü pozitif bulunan örneklerin IIFT ile tekrar değerlendirilmesi sonucunda birisinde IgG de eşlik etmek üzere 4 örnekte IgM tipi KKEV antikor pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: İncelenen Olgularda KKEV Serolojik Test Sonuçları

KKEV	ELISA		IIFT	
	Zayıf Pozitif (+)	Orta/Güçlü Pozitif (++)/+++)	Zayıf Pozitif (+)	Orta/Güçlü Pozitif (++)/+++)
IgG	0/94 (%0)	0/94 (%0)	0/94 (%0)	0/94 (%0)
IgM	0/94 (%0)	11/94 (%11.7)	0/94 (%0)	3/94 (%3.1)
IgG+IgM	0/94 (%0)	1/94 (%1)	0/94 (%0)	1/94 (%1)
Toplam	12 (%12.7)		4/12 (%33.3)	

4.3. Çalışma Grubunda Flebovirus-TOSV Enfeksiyonları

4.3.1. Flebovirus-TOSV Nükleik Asit Sonuçları

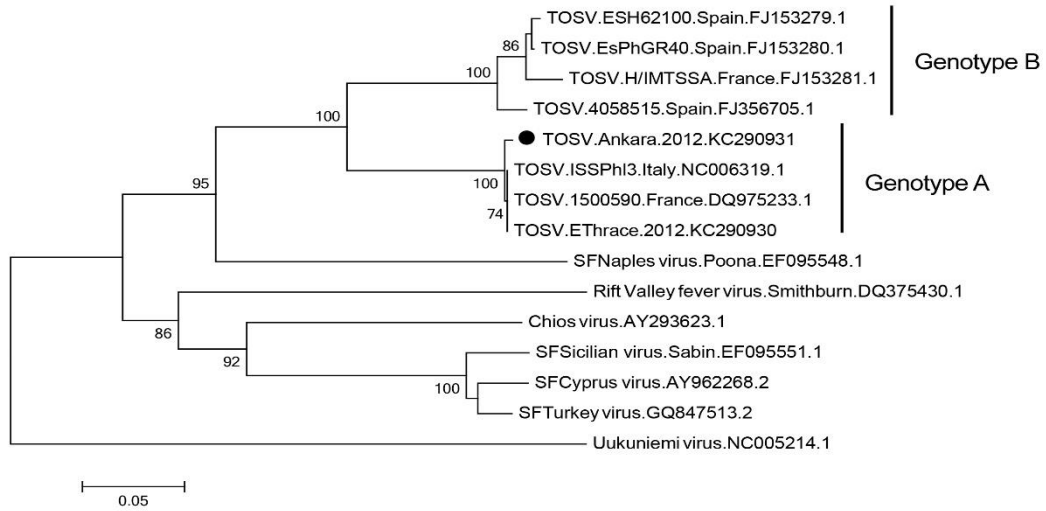
İncelenen olgulardan birinde (1/94, 1.1%) TOSV'a bağlı ateşli hastalık tanısı, serumda viral RNA saptanması ve takip eden örnekte IgM serokonversiyonunun gösterilmesi ile konulmuştur (Tablo 4.4, Olgu 1). Olgu 23 yaşında Ankara'da yaşayan kadın hastadır. Ağustos 2013'de yüksek ateş (39.5°C), halsizlik, titreme, artralji, dengesizlik, kilo kaybı ve gece terlemesi şikayetleriyle başvuran hastada, demir replasmanı aldığı anemi öyküsü mevcuttur. Laboratuvar testlerinde lökopeni (1.2×10^3 hücre/ml), trombositopeni (1.23×10^5 hücre/ml), lenfopeni (500 hücre/ml), hafif yüksek alanin aminotransferaz (ALT, 69U/L), aspartat aminotransferaz (AST, 75U/L), gama-glutamil transferaz (GGT, 58U/L) ve alkalın fosfat (AP, 148U/L), ayrıca düşük hemoglobin (7.5g/dL) ve eritrosit (3.3×10^6 hücre/ml) izlenmiştir. Abdomen ultrasonografisinde minimal hepatosplenomegali izlenen olgu, destekleyici tedaviye yanıt vermiş, lökosit ve trombosit sayıları normalleşerek yatışının 8. gününde taburcu edilmiştir.

Tablo 4.4: TOSV Enfeksiyonu Saptanan Olguların Özellikleri

No.	Yaş/Cinsiyet	Yaşadığı Şehir	Belirti ve Bulgular	Laboratuvar Sonuçları	Tanısal Testler
1	23 / Kadın	Ankara	Ateş, Titreme, Artralji, Baş ağrısı, Kilo kaybı, Gece terlemeleri, Dengesizlik	Lökopeni, Lenfopeni, Trombositopeni, Düşük Hb, Artmış AP, GGT, ALT ve AST	Serumda TOSV RNA (KC290931), TOSV IgM Serokonversiyonu
2	58 / Erkek	Ankara	Ateş, Artralji, Baş ağrısı	Lökositoz, Artmış ESR, CRP ve GGT	Serumda TOSV IgM
3	32 / Erkek	Konya	Ateşli hastalık sonrası ortostatik hipotansiyon, Bulanık görme, Vertigo	Artmış LDH ve CPK	Serumda TOSV IgM
4	24 / Kadın	Ankara	Ateşli hastalık sonrası kas güçsüzlüğü, Halsizlik, Yorgunluk	Lökositoz, Artmış BOS proteini	Serumda TOSV IgM
5	36 / Kadın	Antalya	Baş ağrısı, Bulanık görme, Bulantı ve kusma	Lökositoz, Artmış ESR, Artmış BOS basıncı ve BOS proteini,	Serumda TOSV IgM
6	24 / Kadın	Mersin	Baş ağrısı, Halsizlik, Yorgunluk, Kaslarda parezi, Fasiyal paralizi, Sensörinöral işitme kaybı, Bulanık görme, Bulantı ve kusma	Lökositoz, Lenfopeni, Artmış ESR, ALT, AST, GGT, Artmış BOS basıncı ve BOS proteini	Serumda TOSV IgM + IgG, BOS'ta TOSV IgM

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı; CRP: C-reaktif protein; AP: Alkalın fosfataz; ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; GGT: Gama-glutamil transferaz; LDH: Laktat dehidrogenaz; CPK: Kreatin fosfokinaz

Hastaneye kabulünün ilk gününde alınan serum örneğinde Pan-Flebovirus PCR pozitif sonuç vermiş, ampikonların dizi analizi ile enfeksiyon oluşturan virus "TOSV genotip A" olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.3). Elde edilen 247 baz çiftlik kısmi dizinin (GenBank ulaşım kodu: KC290931), daha önce hastanemizde saptanan dizi ile (GenBank ulaşım kodu: HM151316) aynı olduğu izlenmiş, ayrıca 2012 yılında Trakya bölgesinde saptanan dizilere %99.19 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Olgudan takip sırasında 4. günde alınan serum örneği, viral RNA açısından negatif olarak izlenmiş, ancak zayıf TOSV IgM pozitifliği saptanmıştır.



Şekil 4.3: 1 Numaralı TOSV Olgusunda (Tablo 4.4) Serum Örneğinde Saptanan Kısmi TOSV Dizilerinin Analizi. Filogenetik ağaç "Neighbor-Joining" yöntemi ve MEGA v.5 yazılımı (www.megasoftware.net) ile oluşturulmuştur. "Bootstrap" değerleri ağaçta gösterilmiş ve 500 replikasyon için hesaplanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan Flebovirus dizileri için izolat isimleri ve GenBank ulaşım kodları belirtilmiştir. Uukuniemi virusuna ait dizi "outlier" olarak analize eklenmiştir. (●: Çalışmada elde edilen dizi).

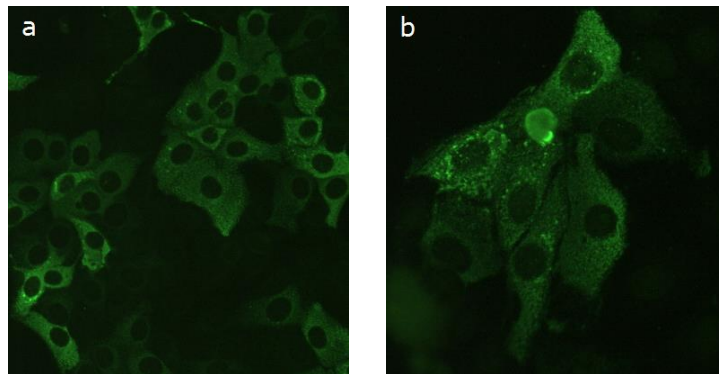
4.3.2. TOSV Antikor Sonuçları

IIFT yöntemi ile yapılan değerlendirmede 36 olguda (36/94, %38.3) TOSV antikorları açısından pozitiflik izlenmiştir (Tablo 4.5). Biri hariç tüm olgularda BOS'ta IgM ve IgG antikorları negatif bulunmuştur. Bir olguda serumda güçlü IgM ve zayıf IgG pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4.4, Olgu 6). Aynı olguda BOS'ta zayıf IgM pozitifliği de saptanmıştır.

Tablo 4.5: İncelenen Olgularda TOSV Serolojik Test Sonuçları

TOSV	IIFT	
	Zayıf Pozitif (+)	Orta/Güçlü Pozitif (++/+++)
IgG	11/94 (%11.7)	4/94 (%4.2)
IgM	7/84 (%7.4)	12/94 (%12.7)
IgG + IgM	0/94 (%0)	2/94 (%2.1)
Toplam	36 (%38.3)	

Çoklu virus antijeni içeren mozaik IIFT ve VNT testi, orta ya da güçlü IIFT pozitifliği izlenen 18 olgunun 13'ünde uygulanmış, 5 olguda örnek miktarının yetersizliği nedeniyle yapılamamıştır. Tüm örneklerde SFNV ve/veya TOSV antijenlerine karşı reaktivite gösterilmiştir.



Şekil 4.4: TOSV Antikorları Pozitif Örneklerin Floresans Mikroskopunda Görünümü (Vero hücresi; a: 1x100 büyütme, b: 1x400 büyütme)

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada ateşli hastalık ya da menenjit/meningoensefalit şeklinde klinik bulgu veren vektör-kaynaklı viral enfeksiyonlar, endemik bölgelerde yaşayan veya buraya seyahat eden kişilerde önemli bir sağlık sorunu olarak izlenmektedir. Bu enfeksiyonların etkilediği bölgelerin, küresel ısınma, ticaret ağlarının genişlemesi, hızlı ve yaygın seyahat olanaklarının artışı gibi çeşitli sebeplerle genişleyeceği de öngörülmektedir. Vektör kaynaklı viral enfeksiyonların hemen hiçbirisinin özgül bir antiviral tedavisinin bulunmaması nedeniyle, ilgili virusların epidemiyolojisi ve yayılımının netleştirilmesi, hem enfeksiyonların ortaya çıkabileceği bölgelerin önceden tahmin edilebilmesi, hem de vektör kontrolü ya da aşılama gibi önleyici tedbirlerin zamanında alınabilmesi açısından önem arz etmektedir (212).

BNV, KKEV ve TOSV, geniş kitleleri etkileyen ve nörolojik tutulum sonucunda önemli morbidite ve mortaliteye sebep olan, önemli vektör-kaynaklı viral enfeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır (213). Ülkemiz birçok vektör kaynaklı viral hastalık için endemik kabul edilen coğrafyada yer alması; ayrıca adı geçen bu viruslarla insan maruziyetine işaret eden veriler bulunmasına rağmen, iyi tanımlanmış olgular nadir bildirilmektedir (4). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında MSS tutulumu ile seyredabilen, nedeni belirsiz ateşli hastalıklarda BNV, KKEV and TOSV'nin etken olarak rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Genel olarak viral menenjit ve ensefalitler, çok geniş bir etken yelpazesine ve klinik tabloya sahiptir. Etiyolojinin aydınlatılması için tanısal testlerin yanı sıra böcek ve hayvan ısırıkları, yapılan seyahatler, bağışıklık durumu dahil olmak üzere kapsamlı ve ayrıntılı inceleme gerekmektedir. MSS enfeksiyonu olan hastalarda genellikle ani başlangıçlı ateş, baş ağrısı, ense sertliği, fokal nörolojik defisit, BOS'ta pleositoz, BT veya MRG'de anormallikler ortaya çıkmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen olgularda genel özellikler ve özgül olmayan laboratuvar bulguları da irdelenmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen toplam 94 olgunun 2'sinde (%2.1) akut BNV enfeksiyonu saptanmıştır. Akut enfeksiyon tanısı olguların birinde serum, diğerinde BOS ve serum örneğinde BNV RNA saptanması ve dizi analizi sonucu konulmuştur. Saptanan olgulardaki klinik tablo; 63 yaşında erkek hastada ensefalit bulguları, 87 yaşında kadın hastada ise ensefalit, epileptiform deşarjlar ve myoklonik atımlar şeklindedir (Tablo 4.1). Tanı konulan olgulardan ilki, BNV ensefaliti için oldukça tipik klinik ve laboratuvar bulguları ile seyretmiştir. Ancak 1 no'lu olguda izlenen bulgular atipik özellik göstermektedir. Bu olguda izlenen hiponatremi ve anormal karaciğer enzimleri; rapor edilen serilerde sırasıyla %33-50 ve %21-24 oranlarında saptanmaktadır (214, 215). BOS'ta 40 mg/dl'nin altında glukoz düzeyleri ise çok daha nadirdir ve 238 olgu içeren bir seride sadece bir olguda tanımlanmıştır (216). Ensefalit ile seyreden BNV enfeksiyonlarında EEG'de yaygın, özgül olmayan yavaş dalga anomalileri izlenmektedir (216-218). Herpetik ensefalitlerde sık saptanan bir EEG bulgusu olan PLED, BNV ensefalitinde çok daha nadir olarak ortaya çıkmaktadır (219). Kranial BT genellikle normal olarak izlenir; MRG bulguları ise sıklıkla özgül değildir (216, 220). Bununla birlikte, MRG incelemesinde patoloji izlenen olgularda özellikle bazal gangliyonlar ve talamus bölgesinde sinyal anomalileri rapor edilmektedir (216, 220). 1 no'lu olgumuzda da özellikle ensefalitin belirgin olduğu dönemde, temporoparietal korteks ve talamusta hiperintens lezyonlar izlenmiştir. Sonuç olarak izlediğimiz klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları, olgumuzun BNV'ye bağlı MSS enfeksiyonlarında oldukça nadir görülen bir klinik tablo gösterdiğini ortaya koymaktadır.

BNV'ye bağlı merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu, ensefalit, menenjit ya da miyelit bulguları ile seyredabilmektedir. BNV'ye bağlı nöroinvazif hastalıkların yaklaşık %60'ında ensefalit bulguları görülmekte ve daha ziyade 55 yaşın üzerindeki olgularda veya altta yatan immün yetmezlik varlığında ortaya çıkmaktadır (216, 221). Ancak status epileptikus ve diğer epileptik sendromlar oldukça düşük sıklıkla izlenmekte; üst ekstremiteleri ve/veya yüz kaslarında ortaya çıkan tremor ve miyoklonus, ensefalit izlenen olguların üçte

birinden azında görülmektedir (220, 222). Sık saptanan laboratuvar bulguları ise serumda beyaz küre artışı, BOS'da pleositoz ve artmış protein düzeyidir (220).

Ülkemiz kaynaklı MSS tutulumu izlenen BNV olgu raporları sınırlı sayıdadır. Ankara bölgesinde, hastanemizde BNV ensefaliti 2009 yılında, 62 yaşında kadın hastada, 2010 yılında ise 56 ve 61 yaşlarındaki iki erkek hastada doğrulanmıştır (81, 82). Bu olgularda fokal nörolojik bulgu izlenmeksizin yüksek ateş, baş ağrısı, halsizlik, konfüzyon ve bilinç kaybı bulguları ortaya çıkmıştır. BOS incelemelerinde lenfositik pleositoz, artmış protein ve özgül IgM antikoru saptanmış; EEG, bilgisayarlı tomografi ya da MRG incelemelerinde ise dikkate değer bulgu rapor edilmemiştir. Tüm olgular destekleyici tedavi ile nörolojik sekel olmadan iyileşmiştir (81, 82). Ankara bölgesinde 2011 yılında rapor edilen bir diğer olguda ise, bilinç bulanıklığı, oryantasyon bozukluğu ve olgumuza benzer şekilde tremor, karaciğer enzimlerinde yükseklik, BOS'da pleositoz ve artmış protein, serumda ise BNV'ye özgül IgM saptanmış; yatışının dokuzuncu gününde hasta eksitus olmuştur (223). 2010 yılında ise Ege bölgesi başta olmak üzere çeşitli illerden olguların saptandığı bir BNV salgını ortaya çıkmış, 35 muhtemel ve 12 serolojik olarak doğrulanmış BNV enfeksiyonu saptanmıştır (80). Olguların 40'ında nöroinvazif bulguların ortaya çıktığı salgında sık izlenen belirtiler ateş, baş ağrısı, bulantı/kusma, bilinç değişiklikleri şeklinde olup, 15 olguda konvülsiyonlar görülmüştür. BOS incelemesinin sınırlı sayıda olguda yapılabildiği salgında, fokal nörolojik bulgular ya da viral RNA pozitifliği konusunda bilgi bulunmamaktadır. Bir diğer olgu ise, renal transplantasyon sonrasında menenjit bulguları ve tonik-klonik nöbetler izlenen ve BOS'da BNV RNA saptanan, Ege bölgesi kökenli bir olgudur (224). Görüldüğü gibi, ülkemiz kaynaklı BNV olgularının önemli bir kısmını MSS tutulumu izlenen ileri yaş ve/veya altta yatan hastalığı olan kişiler, ya da bölgesel salgın şeklinde ortaya çıkan olgular oluşturmaktadır. Bu durum, klinik uygulamalarda BNV de aralarında olmak üzere vektör kaynaklı enfeksiyonların genel olarak ayırıcı tanıda dikkate alınmadığını işaret eder niteliktedir. Serolojik

tanının, çapraz reaksiyonlar nedeniyle sorunlu olduğu; nükleik asit testlerinin ise yaygın olarak uygulanmadığı bu ve benzeri enfeksiyonların, gerçek sıklığı ve yaygınlığının ortaya konulması güç görülmektedir.

Filogenetik analizler, BNV izolatlarının beş farklı genetik köken şeklinde gruplanabileceğini; yaygın olarak dağılım gösteren kökenlerin ise köken 1 ve köken 2 olduğunu göstermektedir (2, 28). Avrupa ve Akdeniz havzasında insan ve atlarda saptanan BNV enfeksiyonlarında sıklıkla köken 1 viruslar saptanmaktadır (2). Bununla birlikte özellikle Yunanistan başta olmak üzere çeşitli Avrupa ülkelerinde köken 2 viruslar görülmekte, bazı ülkelerde her iki kökene ait viruslar dolaşımda bulunabilmektedir (225, 226). Çalışmada tanımlanan olgularda, serum ve BOS örneklerinde saptanılan BNV'nin, köken 1 grup 1a viruslarına yakınlık gösterdiği ortaya konulmuştur (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Aynı köken viruslar ilk kez 2011 yılında, Ankara ve Eskişehir kaynaklı at ve insan olgularında saptanmıştır (227). Sunulan olgudan elde edilen diziler, Orta Anadolu bölgesinde köken 1 virusların dolaşımda olduğunu gösteren ilk verileri doğrular niteliktedir.

Çalışmada incelenen 94 olguda, BNV'ye özgül IgG ve IgM tipi antikorların IIFT yöntemiyle araştırılması sonucu 4 olguda (%4.3) serumda IgM, 5 olguda (%5.3) ise yine serumda IgG tipi antikorlar saptanmıştır (Tablo 4.2). İzlenen seroreaktivitenin BNV açısından özgüllüğünün doğrulanması için, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda altın standart test kabul edilen PRNT yöntemi uygulanmıştır. IIFT ile IgM saptanan örneklerin tamamı PRNT'de negatif olarak izlenmiş; ancak IgG pozitif örneklerde seroreaktivitenin virusa özgül olduğu izlenerek, olguların %5.3'ünde virusa maruziyet doğrulanmıştır. Bu bulgu, olgularda daha önceden meydana gelmiş BNV maruziyetlerine işaret etmektedir.

Ülkemizde insanlarda BNV maruziyetini dair ilk çalışmalar günümüzden yaklaşık 40 yıl öncesinde yapılmış; HI yöntemi ile antikor prevalansı farklı illerde %6 ila %47.8 arasında değişen oranlarda izlenmiştir (70, 228). Bu yüksek

oranların, flaviviruslar arasında izlenen ve HI gibi gruba özgül testlerde ortaya çıkan antijenik çapraz reaksiyonlara bağlı olması kuvvetle muhtemeldir (58). 1980 yılında Ege bölgesinde yapılan ve 1074 kişinin dahil edildiği çalışmada %21.5 oranında nötralizan antikor varlığı bildirilmiştir. Daha yakın tarihte, 2005 yılında Özkul ve arkadaşlarının ülkemizin çeşitli bölgelerinde yaptıkları araştırmasında, BNV seroprevalansı insanlarda %20.4 olarak bulunmuş; 2007 yılında, Güneydoğu Anadolu bölgesinde sağlıklı kişilerde yapılan bir başka çalışmada BNV maruziyeti %9.4 olarak bildirilmiştir. Kan donörlerinde yapılan daha güncel bir çalışmada seroprevalans %0.56 olarak bulunmuş, İç Anadolu bölgesinde ikamet eden kişilerde virusa maruziyet doğrulanmıştır (75). Hastanemiz ve Ankara bölgesinde 2011 yılında, 1200 kan donörünün dahil edildiği araştırmada %0.8 oranında nötralizan antikor tespit edilmiştir (76). Görüldüğü gibi ülkemizin çeşitli bölgelerinden BNV maruziyetine dair çeşitli çalışmalar bulunmakta, %0.56-21.5 arasında değişen oranlarda BNV seroprevalansı bildirilmektedir. Ayrıca 2014 yılında yayınlanan, Mersin ilinde yapılan ve 920 kan donöründe bir başka flavivirus olan Dengue virusunun incelendiği araştırmada, ELISA ile 160 örnekte pozitiflik izlenmiş, çapraz reaksiyonu ekarte edebilmek için yapılan BNV PRNT'de 137 örnekte BNV nötralizan antikorların varlığı saptanmıştır (229). Bu çalışmadan elde edilen veriler, flaviviruslara karşı izlenen seroreaktivitenin en önemli nedeninin BNV enfeksiyonlarına bağlı olduğunu gösterir niteliktedir.

BNV, çok çeşitli memeli türünü enfekte edebilmektedir. Ülkemiz adresli çalışmalarda, çeşitli insan dışı duyarlı konaklarda virusa maruziyet gösterilmiştir (4). Bunların arasında farklı bölgelerden 10 ilde yapılan bir serosürveyans çalışmasında birçok memeli türünde virusa maruziyeti doğrulanmış, katırlarda %2.5, büyükbaş hayvanlarda %4, köpeklerde %37.7, atlarda %13.5 ve koyunlarda %1 oranlarında nötralizan antikorlar tespit edilmiştir (73). Atlarda 2013 yılında semptomatik enfeksiyonların görüldüğü Eskişehir'de 2013 yılında yapılan bir seroprevalans %31.6 olarak bildirilmiş oranında; takip eden çalışmalarda yaygın bir coğrafyadan elde edilen örneklerde, aralarında koyunlar, ördekler ve atlar olan bir kohortta seroprevalans %1.9-10.5

oranlarında izlenmiş, ayrıca asemptomatik viremi saptanan atlar tespit edilmiştir (227, 230). Tüm bu veriler, insan harici çeşitli konaklarda virus maruziyetini doğrulamakta, virusun ülkemizde yaygın olarak bulunduğunun altını çizmektedir.

Diğer bir vektör kaynaklı viral MSS enfeksiyonu etkeni olan KKEV'dir. KKEV enfeksiyonları asemptomatik veya grip benzeri hastalık şeklinde geçirebileceği gibi olguların yaklaşık üçte birinde MSS tutulumu görülmektedir. MSS enfeksiyonları hafif menenjit bulgularından ağır ensefalite kadar değişebilen şiddette seyretmekte, ayrıca kalıcı sekele neden olabilmektedir (133). Ülkemizdeki KKEV aktivitesine dair bilgiler, Akdeniz ve Ege bölgesi kaynaklı klinik olgu ve kısıtlı gruplarda serosürveyans verileri şeklindedir (4). Daha güncel çalışmalarda ise virus maruziyeti Karadeniz ve İç Anadolu bölgelerinde saptanmış, Ankara ilinden muhtemel olgular rapor edilmiştir (4, 82).

Ülkemizden bildirilen ilk muhtemel KKE olguları 1968 yılında İzmir'den bildirilmiş; etiyojisi aydınlatılmayan MSS tutulumu olan 3 kişide akut ve konvelesan serum örneklerinde artan KKEV antikor titresindeki artış, HI yöntemi ile gösterilmiştir (150). Olguların tamamında ağırlıklı olarak menenjit bulguları öne çıkmış ve hastalık sekelsiz iyileşmiştir. Tokat'ta 2008 yılında yapılan bir araştırmada, Kırım Kongo kanamalı ateşi şüpheli 39 hastanın 7'sinde ELISA ile KKEV IgG tipi antikor varlığı gösterilmiş, bir hastanın muhtemel KKE olgusu olabileceği bildirilmiştir (231). Rapor edilen olgu, çiftçilikle uğraşan 74 yaşında erkek hasta, ateş, halsizlik, baş ağrısı ve bilinç kaybı ile başvurmuş, serumda KKEV IgM pozitifliği, lökositoz ve trombositopeni izlenmiştir. Kene ısırığı öyküsü olmayan hastada genel durum giderek bozularak, başvurunun üçüncü haftasında ölümle sonuçlanmıştır. Hastanemiz kaynaklı olgularda 2009 yılında yapılan bir çalışmada da, nedeni bilinmeyen MSS enfeksiyonu ön tanısıyla izlenen 108 hastanın 8'inin (%7.4) serum örneğinde IgM tipi KKEV antikorları gösterilmiştir (151). Olguların hafif seyirli menenjit veya meningoensefalit tablosu gösterdiği, ayrıca bir hastada kene ısırığı öyküsü ve

KKE'de sık rastlanan bifazik klinik seyir izlendiği bildirilmiştir. Araştırmada saptanan olguların, ensefalit bulguları ile izlenen ve taburculukta kas parezisi devam eden hasta haricinde sekelsiz iyileştiği bildirilmektedir.

Çalışmamızda incelenen olgularda KKEV maruziyeti, yalnız serolojik testler kullanılarak araştırılmıştır. Bunun başlıca nedenleri, kısıtlı miktarda elde edilebilen özellikle BOS gibi örneklerde, dolaşımda daha yaygın bulunan diğer etkenlerin öncelikli olarak incelenmesi ve KKE olgularında MSS tutulumunun daha geç dönemde ortaya çıkması nedeniyle viral nükleik asit saptanma oranının düşük olması sayılabilir (137). Çalışmada yapılan değerlendirmede, KKEV ELISA ile 11 serum örneğinde IgM, 1 serum örneğinde ise IgM ve IgG tipi antikorlar saptanmıştır. Antikor tespit edilen örneklerde IIFT ile yapılan yeniden değerlendirmede ise, IgM saptanan 11 örneğin 3'ünde, IgM ve IgG saptanan 1 örnekte ise IIFT ile pozitiflik elde edilmiştir (Tablo 4.3). Bu sonuçlara karşın, özgüllük doğrulaması için Robert Koch Enstitüsü KKEV Referans Laboratuvarı'nda (Berlin, Almanya) uygulanan PRNT'de tüm örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak farklı testlerde saptanan seroreaktiviteye rağmen, elde edilen pozitif sonuçlar KKEV açısından doğrulanamamıştır. İncelenen örneklerin hepsi BNV IIFT IgM ve IgG açısından negatiftir. Bu bulgular, çalışma grubunda KKEV'nin etken olduğu klinik sendromların bulunmadığına işaret etmekte; izlenen seroreaktivitenin ise yalancı pozitiflik olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, ülkemizde bulunan ve çapraz reaksiyon nedeni olabilecek BNV maruziyeti ekarte edilse bile, uygun klinik tabloya sahip olgularda dahi, özgüllük doğrulaması yapılmadan KKEV ile ilgili pozitif tarama testi sonuçlarına şüphe ile yaklaşılması gerektiğini göstermektedir.

BNV ile karşılaştırıldığında görece daha nadir olmasına karşın, Türkiye kaynaklı raporlarda, doğrulanmış KKEV maruziyeti saptanmıştır. Örneğin Ege bölgesinde uygulanan bir arbovirus serosürveyansında; incelenen 1074 sağlıklı kişinin 13'ünde (%1.21) nötralizan antikor varlığı gösterilmiştir (72). 2009 yılında 2454 sağlık kan donörünü kapsayan bir çalışmada ise, KKEV

seroprevalansı %1.9 (47/2454) olarak izlenmiş; Zonguldak ili'nde ikamet eden ve ormanlık bölgelerde vakit geçirme öyküsü olan, sağlıklı bir kan donöründe saptanan pozitiflik, PRNT ile doğrulanmıştır (151). Bu veriler, ülkemiz kaynaklı KKEV maruziyetinin nadir de olsa gerçekleşebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte gerek doğrulanmış serosürveyans verileri, gerek kesitsel olgu incelemeleri, KKEV enfeksiyonun BNV ya da TOSV'a göre çok daha düşük oranda ortaya çıktığına işaret etmektedir. KKEV ile ilgili çalışmaların, özellikle vektör *I. ricinus* cinsi kenelerin endemik olarak bulunduğu bölgelerde yapılması, virusun epidemiyolojisi konusunda daha güncel verilerin üretilmesi açısından etkili olabilir.

Çalışmamızda incelenen MSS enfeksiyonu etkeni bir diğer virus ise TOSV'dur. TOSV, içinde bulunduğu *Bunyaviridae* ailesi *Flebovirus* cinsindeki viruslar arasında, nörotropizm ve MSS tutulumu ile seyrettiği kesin olarak gösterilmiş tek virustur (166). Çalışmada incelenen 94 olgunun 2'sinde (%2.1), akut TOSV enfeksiyonu tanısı konulmuştur. Olgulardan ilki, MSS bulguları izlenmeyen ateşli hastalık nedeniyle hastanemize başvurmuş, alınan serum örneğinde TOSV RNA saptanarak tanı almış ayrıca takip örneğinde IgM serokonversiyonu gösterilmiştir (Tablo 4.4; Olgu 1). Amplikonların dizi analizi, enfeksiyon etkeni izolatın TOSV genotip A izolatının, olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.3). Ateşli evreyi takiben fasiyal paralizi ve işitme bozukluğu izlenen diğer olguda, IIFT ile serumda IgM+IgG pozitifliği, BOS'ta ise IgM pozitifliği saptanarak tanı konulmuştur (Tablo 4.4; Olgu 6). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda uygulanan nötralizasyon testleri ile olguda serumda saptanan IgM ve IgG tipi antikorların TOSV için özgüllüğü doğrulanmıştır. BOS'ta saptanan IgM pozitifliği yetersiz örnek miktarı nedeniyle değerlendirmeye alınamamıştır. Olguların 4'ünde ise, viral RNA ya da BOS'ta antikor saptanması olmadan, serumda özgül IgM tipi antikorlar saptanmıştır (Tablo 4.4; Olgu 2-5). Bu olgular, Amerikan "Centers for Disease Control and Prevention" 'un nöroinvazif arbovirus enfeksiyonları için önerdiği kriterlere göre "muhtemel enfeksiyon" olarak sınıflandırılmaktadır (232). Bu ve benzeri

durumlarda enfeksiyonun etyolojisinin kesin olarak ifade edilememesinin nedenleri arasında, serumda IgM saptanan etkenle olan maruziyetin, mevcut nörolojik bulgular ile doğrudan ilişkilendirilememesi ve arasında BNV ve TOSV'un da olduğu bazı vektör kaynaklı enfeksiyonlarda izlenebilen uzamış IgM pozitifliğidir. Sonuç olarak çalışmamızda viral RNA, antikor saptanması ve klinik bulgular ile toplamda 6 olguda (%6.4) TOSV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu olgular, 2009'dan bu yana Orta Anadolu bölgesinde saptanmış olan ilk olgulardır.

TOSV virus enfeksiyonları sıklıkla asemptomatik serokonversiyonla sonuçlanmaktadır (174). Semptomatik seyreden enfeksiyonlarda klinik belirti ve bulgular ise sıklıkla yüksek ateş, baş ağrısı, kas-eklem ağrıları ve aseptik menenjit ya da meningoensefalit bulguları şeklindedir. Olgular genellikle 7-10 gün içerisinde sekelsiz olarak iyileşmektedir (194, 233). Bununla birlikte TOSV enfeksiyonları sırasında ya da sonrasında şiddetli ensefalit, myozit ve fasiit, hidrosefali, psikiyatrik bulgular, işitme kaybı, konuşma bozukluğu, pareziler, difüz intravasküler koagülasyon ve testiküler bulgular nadir olarak rapor edilmiştir (234-237).

Bu çalışmada viral RNA saptanması ve takip eden IgM pozitifleşmesi ile tanı konulan akut TOSV olgusu olan 23 yaşındaki kadın hastada, MSS bulguları izlenmeden ateşli hastalık şeklinde belirtiler ortaya çıkmıştır (Tablo 4.4; Olgu:1). Yine bu hastada, geçici bir pansitopeni tablosu izlenmiş, enfeksiyonun ortadan kalkmasından sonra bu durum normale dönmüştür. TOSV enfeksiyonları sırasında pansitopeni gelişimi, daha önce literatürde bildirilmemiştir. TOSV IgM pozitifliği izlenen diğer 4 olguda ise periferik ya da kraniyal sinir tutulumu bulguları izlenmiştir (Tablo 4.4; Olgu:2-6). Raporlar görece az sayıda da olsa, ülkemizde daha önceden bildirilen TOSV enfeksiyonları, genellikle ensefalit bulguları izlenmeyen hafif seyirli menenjit ve/veya ateşli hastalık şeklinde izlenmiştir (82, 172). Akut TOSV enfeksiyonlarının ilk bildirişi 2009 yılında, hastanemiz kaynaklı 102 meningoensefalit ön tanısı olan hastalarda serum örneklerinde viral RNA

saptanması şeklinde yapılmış, hastaların çoğunluğu hafif seyirli bir menenjit veya ateşli hastalık tablosuyla izlenmiş ve sekelsiz iyileşmişlerdir (172). L ve S segmenti dizi analizi, etken virusun İtalya ve Fransa'da dolaşımında olan TOSV genotip A izolatlarına yakınlığını ortaya koymuştur. Bir sonraki yıl İzmir ve Ankara'da, 125 hastayı kapsayan bir çalışmada 12 olgu, TOSV IgM saptanması ile muhtemel TOSV enfeksiyonu olarak değerlendirilmiştir (82). Olgularda BOS'da normal ya da artmış protein, bazı olgularda pleositoz saptanmış, klinik prezentasyon sıklıkla hafif menenjit ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Doğu Trakya'da, 2012 yılında yapılan çalışmada ise, ateşli hastalık salgını sırasında değerlendirilen olgularda TOSV RNA saptanmış, bir olguda ise eş zamanlı TOSV ve BNV enfeksiyonu ilk kez bildirilmiştir (209). İstanbul'da yaşayan HIV pozitif bir olguda da ateşli hastalık sırasında alınan serum örneğinde TOSV RNA saptanmış, yapılan semptomatik tedavi ile bulguları gerilemiştir (238). Yapılan dizi analizleri, ülkemizde insan olgularında saptanan TOSV izolatlarının, çalışmamızda da benzer bulgular elde ettiğimiz, TOSV genotip A izolatlarına filogenetik yakınlığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda IIFT ile inceleme sonrası 94 hastanın 15'inde (%15.9) IgG tipi antikorlar saptanmış, 2 olguda (%2.1) VNT ile doğrulanmış IgG pozitifliği izlenerek önceden gerçekleşmiş virus maruziyeti saptanmıştır. Ülkemizde TOSV'a dair ilk veriler 2003 yılında, Özbel ve arkadaşlar tarafından bildirilmiş olup, Aydın ilinde sağlıklı kişilerde, ELISA ve VNT ile TOSV seroprevalansı %55 olarak bulunmuştur (207). İç Anadolu ve Karadeniz bölgesi kaynaklı kan donörlerinde %14.7 oranında TOSV nötralizan antikorlar saptanarak, bu bölgelerde de TOSV aktivitesi gösterilmiştir (172). Hastanemiz kan bankası kaynaklı, asemptomatik donörlerde yapılan bir diğer çalışmada ise %5.2 oranında nötralizan antikor seroprevalansı varlığı bildirilmiştir (208). Trakya'da 2012 yılında ortaya çıkan bir salgın sonrasında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, yine sağlıklı kan donörlerinde doğrulanmış TOSV maruziyeti %14.4 olarak izlenmiştir. Tüm bu araştırmalar, virusun Orta Anadolu, Ege, Trakya ve Karadeniz bölgelerinde yer alan birçok ilde virusa maruziyete işaret etmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda hastanemize başvuran nedeni bilinmeyen ateş ve merkezi sinir sistemi viral enfeksiyonları izlenen toplam 8 olguda (8.5%) doğrulanmış ya da muhtemel BNV veya TOSV enfeksiyonları saptanmış, 7 olguda (%7.4) ise, daha önce gerçekleşmiş BNV veya TOSV maruziyeti gösterilmiştir. Bu çalışmada KKEV ile ilişkili olgu ya da etkene maruziyet saptanmamıştır.

Toplam 2 olguda doğrulanmış BNV enfeksiyonu gösterilmiş, her iki olguda da, köken 1 grup 1a izolatların etken olduğu belirlenmiştir. Bu durum, daha önceden Orta Anadolu bölgesinde saptanan BNV köken 1 aktivitesini doğrular niteliktedir.

Toplam 2 olguda doğrulanmış, 4 olguda ise muhtemel TOSV enfeksiyonları saptanmıştır. TOSV RNA'sı saptanan olguda izolatın genotip A suşlarına filogenetik benzerliği ortaya konulmuştur. Bu bulgu da, daha önceden rapor edilen ön bulguları desteklemekte; bölgemizde TOSV genotip A izolatlarının bulunduğunu doğrulamaktadır. TOSV RNA'sı saptanan olguda geçici pansitopeni izlenmiş; bu durum TOSV enfeksiyonlarında ilk kez rapor edilmiştir.

Sonuç olarak bölgemizde süregelen BNV ve TOSV aktivitesi doğrulanmış, ilgili etkenlerle enfeksiyonların diğer bölgelerimizde de izlendiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. TOSV ve BNV, nedeni bilinmeyen ateşli hastalık, menenjit ve ensefalit durumlarında etken olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKÇA

1. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral research*. 2010;85(2):328-45.
2. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2004;23(3):147-56.
3. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(11):1657-63.
4. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2011;11(6):731-41.
5. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1940;20:471-92.
6. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:117-26.
7. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clinics in laboratory medicine*. 2010;30(1):47-65.
8. Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(1):128-32.

9. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of West Nile virus in Israel. *The Journal of infectious diseases*. 1953;93(3):207-18.
10. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1956;5(4):579-620.
11. Hayes CG. West Nile Fever. In: Monath TP, editor. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Volume V. 1989. p. 59-88.
12. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*. 1976;72:295-300.
13. Panthier R. Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. I. Introduction. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1968;114(4):518-20.
14. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever : a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):643-50.
15. Reiter P. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010;15(10):19508.
16. Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):621-5.

17. Briese T, Jia XY, Huang C, Grady LJ, Lipkin WI. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet*. 1999;354(9186):1261-2.
18. Jia XY, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chi HC, Mackenzie JS, et al. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet*. 1999;354(9194):1971-2.
19. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*. 1999;286(5448):2333-7.
20. Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, et al. West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):659-61.
21. Sejvar JJ. West Nile virus: an historical overview. *The Ochsner journal*. 2003;5(3):6-10.
22. Marfin AA, Petersen LR, Eidson M, Miller J, Hadler J, Farello C, et al. Widespread West Nile virus activity, eastern United States, 2000. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):730-5.
23. Centers for Disease C, Prevention. Provisional surveillance summary of the West Nile virus epidemic--United States, January-November 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2002;51(50):1129-33.
24. Gubler DJ. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(8):1039-46.

25. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of virology*. 1998;72(1):73-83.
26. Gyure KA. West Nile virus infections. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009;68(10):1053-60.
27. Murray KO, Mertens E, Despres P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Veterinary research*. 2010;41(6):67.
28. 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. *Journal of virology*. 2011;85(6):2964-74.
29. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenbock H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(4):618-23.
30. Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E, et al. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;17:46-50.
31. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(8):1174-9.
32. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*. 1990;44:649-88.
33. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(9):519-29.

34. 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.
35. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22.
36. Guo JT, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *Journal of virology*. 2005;79(3):1343-50.
37. 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. *Journal of virology*. 2005;79(3):1934-42.
38. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *Journal of virology*. 2006;80(19):9349-60.
39. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO journal*. 2002;21(11):2757-68.
40. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(8):1167-73.
41. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *Journal of medical entomology*. 2005;42(1):57-62.

42. Petersen LR, Roehrig JT, Hughes JM. West Nile virus encephalitis. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1225-6.
43. Chu JJ, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of virology*. 2004;78(19):10543-55.
44. Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of virology*. 2001;75(22):10787-99.
45. Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS letters*. 2001;500(1-2):17-24.
46. Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(3):702-9.
47. Hunsperger EA, Roehrig JT. Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *Journal of neurovirology*. 2006;12(2):129-39.
48. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *The New England journal of medicine*. 2001;344(24):1807-14.
49. Sampathkumar P. West Nile virus: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *Mayo Clinic proceedings*. 2003;78(9):1137-43; quiz 44.

50. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. *Annals of internal medicine*. 2002;137(3):173-9.
51. Han LL, Popovici F, Alexander JP, Jr., Laurentia V, Tengelsen LA, Cernescu C, et al. Risk factors for West Nile virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(1):230-3.
52. Sejvar JJ, Leis AA, Stokic DS, Van Gerpen JA, Marfin AA, Webb R, et al. Acute flaccid paralysis and West Nile virus infection. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(7):788-93.
53. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, et al. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2010;17(8):999-e57.
54. Shi PY, Kramer LD. Molecular detection of West Nile virus RNA. *Expert review of molecular diagnostics*. 2003;3(3):357-66.
55. Kauffman EB, Jones SA, Dupuis AP, 2nd, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD. Virus detection protocols for west nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(8):3661-7.
56. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(11):4066-71.
57. Shi PY, Kauffman EB, Ren P, Felton A, Tai JH, Dupuis AP, 2nd, et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(4):1264-71.

58. 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.
59. Gould EA, Higgs S, Buckley A, Gritsun TS. Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(4):549-55.
60. Hartemink NA, Davis SA, Reiter P, Hubalek Z, Heesterbeek JA. Importance of bird-to-bird transmission for the establishment of West Nile virus. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2007;7(4):575-84.
61. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p. 1043-126.
62. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*. 1976;72:295-300.
63. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *The open virology journal*. 2010;4:29-37.
64. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004;27(5):343-55.
65. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V, et al. West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2008;13(45):pii: 19030.

66. Barzon L, Squarzon L, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Cusinato R, et al. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2009;14(31).
67. Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2009;14(40).
68. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010;15(34).
69. Hayes CG. West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;951:25-37.
70. Ari A. The prevalence and ecology of arboviruses in Turkey. *Turk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*. 1972;32(2):134-43.
71. Radda A. Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *EU Tıp Fak Mec*. 1971;10:227-9.
72. Serter D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. *Zentralblatt Fur Bakteriologie*. 1980;9:155-61.
73. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology and infection*. 2006;134(4):826-9.

74. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2007;7(2):157-61.
75. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Menemenlioglu D, Turan HM, Ozkul A, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2010;10(8):771-5.
76. Ayturan S, Aydogan S, Ergunay K, Ozcebe OI, Us D. [Investigation of West Nile virus seroprevalence in Hacettepe University Hospital blood donors and confirmation of the positive results by plaque reduction neutralization test]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2011;45(1):113-24.
77. Ergunay K, Aydogan S, Menemenlioglu D, Sener B, Lederer S, Steinhagen K, et al. [Investigation of West Nile virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2010;44(2):255-62.
78. Arpacı F, Çetin T, Kubar A. West Nile virus infection in a patient with acute graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2009;94(S2):687.
79. Sener K, Yapar M, Koru O, Kubar A. Detection of West Nile virus in a patient with acute graft-versus-host disease by using a new developed one-step real time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology*. 2009;46(S1):S43.
80. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(21).

81. Ergunay K, Ozkul A. [Confirmation of West Nile virus seroreactivity in central nervous system infections of unknown etiology from Ankara Province, Central Anatolia, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2011;45(2):381-3.
82. Ergunay K, Sayiner AA, Litzba N, Lederer S, Charrel R, Kreher P, et al. Multicentre evaluation of central nervous system infections due to Flavi and Phleboviruses in Turkey. *The Journal of infection*. 2012;65(4):343-9.
83. Labuda M, Nuttall PA. Tick-borne viruses. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S221-45.
84. Schneider H. Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wiener klinische Wochenschrift*. 1931;44:350-2.
85. Mantke OD, Karan LS, Ruzek D. Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview. In: Ruzek D, editor. *Flavivirus Encephalitis: InTech*; 2011. p. 133-56.
86. Zilber L. Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkhiv Biologicheskikh Nauk*. 1939;56:255-61.
87. Chumakov MP, Zeitlenok NA. Tick-borne Spring-Summer encephalitis in the Ural region. *Neuroinfections in the Ural. Sverdlovsk*.1940. p. 23-30.
88. Petrishcheva PA, Levkovich EN. Spring-Summer encephalitis in Leningrad region. *Papers of Medical Officers of Volkhov Front. Leningrad, Rusya*.1945.
89. Pavlovsky E. Ticks and tick-borne encephalitis. *Parazitologia Dalnego Vostoka*. 1947;5:212-64.

90. Gallia F, Rampas J, Hollender L. Laboratory infections caused by tick-borne encephalitis virus. *Casopis lekaru ceskych*. 1949;88:224-9.
91. Rampas J, Gallia F. Isolation of tick-borne encephalitis virus from ticks *Ixodes ricinus*. *Casopis lekaru ceskych*. 1949;88(1179-1180).
92. Fornosi F, Molnar E. [Meningoencephalitis in Hungary]. *Orvosi hetilap*. 1952;93(35):993-6.
93. Szajna M. [Tick-borne encephalitis in Poland]. *Polski tygodnik lekarski*. 1954;9(51-52):1625-7.
94. Vaptsarov I, Turpomanov A, Spasov Z, Nikov D, Dragiev M. [Recurrent viral meningoencephalitis in southern Bulgaria]. *Suvremenna meditsina*. 1954;5(2):86-103.
95. Bedjanic M, Rus S, Kmet J, Vesenjajk-Zmijanac J. Virus meningoencephalitis in Slovenia. *Bulletin of the World Health Organization*. 1955;12(4):503-12.
96. Pattyn SR, Wyler R. [Viral meningoencephalitis in Austria. IV. Virus in blood in experimental infection; attempted transmission by mosquitoes]. *Bulletin of the World Health Organization*. 1955;12(4):581-9.
97. Draganescu N. [Inframicrobial meningoencephalitis belonging to the group transmitted by arthropods. Identification of the pathogenic agent and study of the nerve lesions induced in white mice]. *Studii si cercetari de inframicrobiologie*. 1959;10:363-9.
98. Sinnecker H. Zeckenencephalitis in Deutschland. *Zentralblatt Für Bakteriologie*. 1960;180:12-8.

99. Oker-Blom N. Kumlinge disease; a meningo-encephalitis occurring in the Aaland Islands. *Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae*. 1956;34(3):309-18.
100. Kaäriainen LE, Hirvonen E, Oker-Blom N. Geographical distribution of biphasic tick-borne encephalitis in Finland. *Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae*. 1961;39:316-28.
101. Ando K, Kuratsuka K, Arima S, Hironaka N, Honda Y, Ishii K. Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *The Kitasato archives of experimental medicine*. 1952;24(3-4):557-62.
102. Blaškovič D. Outbreak of tick-borne encephalitis in Rožňava natural focus. Bratislava: Vydavateľstvo SAV; 1954.
103. Ruzek D, Dobler G, Donoso Mantke O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel medicine and infectious disease*. 2010;8(4):223-32.
104. Drozdov SG. [Role of domestic animals in epidemiology of diphasic milk fever]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. 1959;30(4):102-8.
105. Gresikova M, Kaluzova M. Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta virologica*. 1997;41(2):115-24.
106. Daneš L. Human infections with tick-borne encephalitis virus. *Medicína*. 2000;3(16).

107. Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, et al. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of virological methods*. 2010;163(2):481-5.
108. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 2008;371(9627):1861-71.
109. Randolph S. The changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe. *Eurosurveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2002;6(23):pii=1953.
110. Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, et al. Family Flaviviridae. In: Andrew MQK, Michael JA, Eric BC, Elliot JL, editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Part II – The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier Academic Press; 2012. p. 1002-20.
111. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, et al. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. 2007;361(1):80-92.
112. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral research*. 2003;57(1-2):129-46.
113. Hubalek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology research*. 2012;111(1):9-36.

114. Murphy F. Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW, editor. *The Togaviruses Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press.; 1980. p. 241-316.
115. Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic acids research*. 1997;25(6):1194-202.
116. Gritsun TS, Liapustin VN, Karganova GG, Lashkevich VA. [Nonvirion (soluble) antigen of the tick-borne encephalitis virus]. *Voprosy virusologii*. 1988;33(2):217-27.
117. Loktev VB, Ternovoi VA, Netesov SV. Molecular genetic characteristics of tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2007;52(5):10-6.
118. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61.
119. Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of virology*. 2005;79(20):12828-39.
120. Blaskovic D. Tick-borne encephalitis in Czechoslovakia. *Archives of environmental health*. 1970;21(3):453-61.
121. Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttall PA. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *Journal of medical entomology*. 1993;30(1):295-9.
122. Gritsun TS, Nuttall PA, Gould EA. Tick-borne flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;61:317-71.

123. MacLeod J. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. *Parasitology*. 1935;27(01):123-44.
124. Randolph S, Miklisova D, Lysy J, Rogers D, Labuda M. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*. 1999;118(02):177-86.
125. Nuttall PA, Jones LD, Labuda M, Kaufman WR. Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of medical entomology*. 1994;31(1):1-9.
126. Suss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 1:S19-35.
127. Chunikhin SP, Stefuktina LF, Korolev MB, Reshetnikov IA, Khozinskaia GA. [Sexual transmission of the tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks (*Ixodidae*)]. *Parazitologiya*. 1983;17(3):214-7.
128. Tonteri E, Jaaskelainen AE, Tikkakoski T, Voutilainen L, Niemimaa J, Henttonen H, et al. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):72-5.
129. Stahl JP, Mailles A, Dacheux L, Morand P. Epidemiology of viral encephalitis in 2011. *Medecine et maladies infectieuses*. 2011;41(9):453-64.
130. Monath TP. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology*. 2 ed. New York: Raven Press; 1990. p. 763-814.
131. Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 (Pt 11):2067-78.

132. Haglund M, Gunther G. Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 1:S11-8.
133. Gunther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Skoldenberg B. Tick-borne encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome. *Journal of neurology*. 1997;244(4):230-8.
134. Gustafson R, Svenungsson B, Forsgren M, Gardulf A, Granstrom M. Two-year survey of the incidence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1992;11(10):894-900.
135. Duniewicz M, Mertenova J, Moravcova E, Jelinkova E, Holy M, Kulkova H, et al. Central european tick-borne encephalitis from 1969 to 1972 in central bohemia. *Infection*. 1975;3(4):223-8.
136. Kaiser R. Tick-borne encephalitis in southern Germany. *Lancet*. 1995;345(8947):463.
137. Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 1:S36-40.
138. Sonnenberg K, Niedrig M, Steinhagen K, Rohwader E, Meyer W, Schlumberger W, et al. State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2004;293 Suppl 37:148-51.
139. Donoso Mantke O, Aberle SW, Avsic-Zupanc T, Labuda M, Niedrig M. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis

virus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;38(1):73-7.

140. Suss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2008;13(26).

141. Donoso Mantke O, Schadler R, Niedrig M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2008;13(17).

142. Pavlidou V, Geroy S, Diza E, Antoniadis A, Papa A. Epidemiological study of tick-borne encephalitis virus in northern Greece. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2007;7(4):611-5.

143. Juceviciene A, Vapalahti O, Laiskonis A, Ceplikiene J, Leinikki P. Prevalence of tick-borne-encephalitis virus antibodies in Lithuania. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2002;25(1):23-7.

144. Kunz C, Hofmann H, Sary A. Field studies with a new tick-borne encephalitis (TBE) vaccine. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*. 1976;234(1):141-4.

145. Kunz C, Hofmann H, Heinz FX, Dippe H. Efficacy of Vaccination Against Tick-Borne Encephalitis. *Wiener klinische Wochenschrift*. 1980;92(22):809-13.

146. Heinz FX, Kunz C, Fauma H. Preparation of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis by continuous flow zonal ultracentrifugation. *Journal of medical virology*. 1980;6(3):213-21.
147. Juceviciene A, Zygutiene M, Leinikki P, Brummer-Korvenkontio H, Salminen M, Han X, et al. Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian domestic animals and ticks. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2005;37(10):742-6.
148. Leonova GN, Ternovoi VA, Pavlenko EV, Maistrovskaya OS, Protopopova EV, Loktev VB. Evaluation of vaccine Encepur Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2007;25(5):895-901.
149. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;10(12):1040-55.
150. Serter F. Tick-borne meningo-encephalitis cases in Izmir area. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1968;7:1-13.
151. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, et al. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses and public health*. 2011;58(3):220-7.
152. Gunes T, Poyraz O, Atas M, Alim A. Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) among the residents of rural areas in Sinop, central Black-Sea region, Turkey. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2010;44(4):585-91.

153. Tezcan S, Kizildamar S, Ulger M, Aslan G, Tiftik N, Ozkul A, et al. Flavivirus seroepidemiology in blood donors in Mersin province, Turkey. *Mikrobiyololoji Bülteni*. 2014;48(4):606-17.
154. Tesh RB. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual review of entomology*. 1988(33):169-81.
155. Pick A. Zur Pathologie und Therapie einer eigenthümlichen endemischen Krankheitsform. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 1886(33):1141-5.
156. Doerr R, Franz K, Taussig S. *Das Papatasi Fieber*: Franz Deuticke, Leipzig-Wien; 1909.
157. Verani P, Nicoletti L. Phlebovirus Infections. In: Porterfield JS, editor. *Kass handbook of Infectious Diseases: Exotic Viral Infections*. London: Chapman&Hall Medical Publisher; 1995. p. 295-317.
158. Guelmino DJ, Jevtic M. An epidemiological and hematological study of sandfly fever in Serbia. *Acta tropica*. 1955;12(2):179-82.
159. Feinsod FM, Ksiazek TG, Scott RM, Soliman AK, Farrag IH, Ennis WH, et al. Sand fly fever-Naples infection in Egypt. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1987;37(1):193-6.
160. Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjok-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bulletin of the World Health Organization*. 1976;54(6):663-74.
161. Tesh RB, Papaevangelou G. Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(1):163-6.

162. Sabin AB. Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1955;4(2):198-207.
163. Verani P, Lopes MC, Nicoletti L, Balducci M. Studies on Phlebotomus transmitted viruses in Italy: I. Isolation and characterization of a Sandfly fever Naples-like virus. *Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zentralblatt Fur Bakteriologie, Supplement*. 1980;9:195-201.
164. Verani P, Ciufolini MG, Caciolli S, Renzi A, Nicoletti L, Sabatinelli G, et al. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterized of a new Phlebovirus (Arabia virus). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1988;38(2):433-9.
165. Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D, et al. Central nervous system involvement during infection by Phlebovirus toscana of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;45(4):429-34.
166. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *Journal of neurovirology*. 2003;9(6):577-83.
167. Plyusnin A, Beaty BJ, Elliott RM. Bunyaviridae. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, San Diego, Elsevier. 2011:693-709.
168. Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, Goldbach R. Genus Phlebovirus in *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee of the Taxonomy of Viruses*, ed: Fauquet CM, Mayo MH, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, Elsevier Academic Press, ABD,. 2005:709-16.

169. Schmaljohn CS, Nichol ST. Bunyaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1741-88.
170. Xu F, Chen H, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, Xiao SY. Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 8):2312-9.
171. Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, et al. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(3):465-8.
172. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Lo MM, Weidmann M, Dilcher M, et al. Sandfly fever virus activity in central/northern Anatolia, Turkey: first report of Toscana virus infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(4):575-81.
173. Navarro-Mari JM, Palop-Borras B, Perez-Ruiz M, Sanbonmatsu-Gamez S. Serosurvey study of Toscana virus in domestic animals, Granada, Spain. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2011;11(5):583-7.
174. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010;15(10):19507.
175. Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Current topics in microbiology and immunology*. 1991;169:91-141.

176. Accardi L, Gro MC, Di Bonito P, Giorgi C. Toscana virus genomic L segment: molecular cloning, coding strategy and amino acid sequence in comparison with other negative strand RNA viruses. *Virus research*. 1993;27(2):119-31.
177. Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gro MC, Takehara K, Hilditch C, et al. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*. 1991;180(2):738-53.
178. Liu DY, Tesh RB, Travassos Da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, et al. Phylogenetic relationships among members of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 2):465-73.
179. Suzich JA, Kakach LT, Collett MS. Expression strategy of a phlebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever virus M segment. *Journal of virology*. 1990;64(4):1549-55.
180. Tesh RB, Modi GB. Studies on the biology of phleboviruses in sand flies (Diptera: Psychodidae). I. Experimental infection of the vector. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1984;33(5):1007-16.
181. Tesh RB, Lubroth J, Guzman H. Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae:Phlebovirus) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1992;47(5):574-81.
182. Tesh RB, Chaniotis BN, Peralta PH, Johnson KM. Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1974;23(2):258-69.

183. Tesh R, Saidi S, Javadian E, Nadim A. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(2):282-7.
184. Cusi MG, Savellini GG, Zanelli G. Toscana virus epidemiology: from Italy to beyond. *The open virology journal*. 2010;4:22-8.
185. Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, Valassina M. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(5):383-8.
186. Konstantinou GN, Papa A, Antoniadis A. Sandfly-fever outbreak in Cyprus: are phleboviruses still a health problem? *Travel medicine and infectious disease*. 2007;5(4):239-42.
187. Sanchez-Seco MP, Echevarria JM, Hernandez L, Estevez D, Navarro-Mari JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *Journal of medical virology*. 2003;71(1):140-9.
188. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(10):2500-2.
189. Valassina M, Valentini M, Valensin PE, Cusi MG. Fast duplex one-step RT-PCR for rapid differential diagnosis of entero- or toscana virus meningitis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2002;43(3):201-5.
190. Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Fiorentini C, Ciufolini MG. Toscana virus infections of the central nervous system in children: a report of 14 cases. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(1):144-8.

191. Echevarria JM, de Ory F, Guisasola ME, Sanchez-Seco MP, Tenorio A, Lozano A, et al. Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2003;26(1):79-84.
192. Mertz GJ. Bunyaviridae: Bunyaviruses, Phleboviruses, Nairoviruses and Hantaviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. 1. A.B.D.: Churchill-Livingstone Inc; 1997. p. 943-71.
193. Valassina M, Meacci F, Valensin PE, Cusi MG. Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: the incisive role of Toscana virus. *Journal of medical virology*. 2000;60(1):86-90.
194. Braitto A, Ciufolini MG, Pippi L, Corbisiero R, Fiorentini C, Gistri A, et al. Phlebotomus-transmitted toscana virus infections of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1998;30(5):505-8.
195. Peyrefitte CN, Devetakov I, Pastorino B, Villeneuve L, Bessaud M, Stolidi P, et al. Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(5):778-80.
196. Hemmersbach-Miller M, Parola P, Charrel RN, Paul Durand J, Brouqui P. Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. *European journal of internal medicine*. 2004;15(5):316-7.
197. Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Valensin PE, Cusi MG. Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(3):483-4.

198. Francisci D, Papili R, Camanni G, Morosi S, Ferracchiato N, Valente M, et al. Evidence of Toscana virus circulation in Umbria: first report. *European journal of epidemiology*. 2003;18(5):457-9.
199. Daldal N, Özbel Y. Phlebotomus spp. Vektörlükleri ve Kontrolü. In: Özcel MA, Daldal N, editors. *Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. 13. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 1997. p. 49-109.
200. Akkafa F, Taşcı S. Şanlıurfanın Phlebotomus faunası. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 1999;23:417-22.
201. Daldal N, Üner A, Yaşarol Ş, Karacasu F, Yurdağül C. Ege ve Akdeniz bölgesinde görülen Phlebotomus türleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 1989;13(1):71-84.
202. Houin R, Abonnenc E, Deniau M. Phlebotomus in the south of Turkey. Results of a sample survey. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1971;46(5):633-52.
203. Ozbel Y, Turgay N, Ozensoy S, Ozbilgin A, Alkan MZ, Ozcel MA, et al. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1995;89 Suppl 1:89-93.
204. Toprak S, Ozer N. Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey. *Medical and veterinary entomology*. 2005;19(1):107-10.
205. Volf P, Ozbel Y, Akkafa F, Svobodova M, Votypka J, Chang KP. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of Phlebotomus sergenti with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of medical entomology*. 2002;39(1):12-5.

206. Yağcı Ş, Dinçer Ş, Eren H. Ankara yöresi Phlebotomus (Diptera: Psychodidae) türleri. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 1998;22(1):53-6.
207. Ozbel Y, Ertabaklar H, Ciufolini MG, Marchi A, Fiarentino C, Erensoy S, et al. Sandfly Fever Viruses (Phleboviruses) Transmitted by Phlebotomus in Turkey. Microbiologica Balkanica, 3rd Balkan Conference of Microbiology; Istanbul, Turkey.2003. p. 1152-5.
208. Ergunay K, Aydogan S, Ilhami Ozcebe O, Cilek EE, Hacıoglu S, Karakaya J, et al. Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. Zoonoses and public health. 2012;59(2):148-54.
209. Erdem H, Ergunay K, Yilmaz A, Naz H, Akata F, Inan AS, et al. Emergence and co-infections of West Nile virus and Toscana virus in Eastern Thrace, Turkey. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014;20(4):319-25.
210. Johnson DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. Emerging infectious diseases. 2001;7(4):739-41.
211. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 2013;30(12):2725-9.
212. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;951:13-24.

213. Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet*. 2002;359(9305):507-13.
214. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, et al. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):654-8.
215. Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, et al. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):675-8.
216. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB, et al. West Nile virus neuroinvasive disease. *Annals of neurology*. 2006;60(3):286-300.
217. Brilla R, Block M, Geremia G, Wichter M. Clinical and neuroradiologic features of 39 consecutive cases of West Nile Virus meningoencephalitis. *Journal of the neurological sciences*. 2004;220(1-2):37-40.
218. Klein C, Kimiagar I, Pollak L, Gandelman-Marton R, Itzhaki A, Milo R, et al. Neurological features of West Nile virus infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *Journal of the neurological sciences*. 2002;200(1-2):63-6.
219. Kleinschmidt-DeMasters BK, Marder BA, Levi ME, Laird SP, McNutt JT, Escott EJ, et al. Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. *Archives of neurology*. 2004;61(8):1210-20.
220. Sejvar JJ, Marfin AA. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Reviews in medical virology*. 2006;16(4):209-24.

221. Hayes EB, Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annual review of medicine*. 2006;57:181-94.
222. DeBiasi RL, Tyler KL. West Nile virus meningoencephalitis. *Nature clinical practice Neurology*. 2006;2(5):264-75.
223. Yesilkaya A, Kurt Azap O, Aarslan H, Yagci Caglayik D, Uyar Y, Korukluoglu G, et al. [A fatal case of West Nile virus encephalitis]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2012;46(3):488-92.
224. Ertlav M, Ozkul A, Zeytinoglu A, Sen S, Sipahi S, Toz H, et al. [Meningoencephalitis Caused by West Nile virus in a renal transplant recipient]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48(4):674-82.
225. Papa A. West Nile virus infections in Greece: an update. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(7):743-50.
226. Magurano F, Remoli ME, Baggieri M, Fortuna C, Marchi A, Fiorentini C, et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(12):E545-7.
227. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, Alkan F, Arsava EM, Tezcan S, et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013;17(7):e546-51.
228. Meco O. [West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 1977;11(1):3-17.

229. Tezcan S, Kizildamar S, Ulger M, Aslan G, Tiftik N, Ozkul A, et al. [Flavivirus seroepidemiology in blood donors in Mersin province, Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48(4):606-17.
230. Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O, Oter K, Gargari S, Karaoglu T, et al. Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(7):e3028.
231. Esen B, Gozalan A, Coplu N, Tapar FS, Uzun R, Aslan T, et al. The presence of tick-borne encephalitis in an endemic area for tick-borne diseases, Turkey. *Tropical doctor*. 2008;38(1):27-8.
232. Centers for Disease Control and Prevention. Arboviral diseases, neuroinvasive and non-neuroinvasive. 2011 case definitions. <http://wwwn.cdc.gov/NNDSS/script/casedef.aspx?CondYrID=616&DatePub=1/1/2011%2012:00:00%20AM>. 2011.
233. Dionisio D, Valassina M, Ciufolini MG, Vivarelli A, Esperti F, Cusi MG, et al. Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype toscana. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;32(8):1241-3.
234. Baldelli F, Ciufolini MG, Francisci D, Marchi A, Venturi G, Fiorentini C, et al. Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(4):515-20.
235. Bartels S, de Boni L, Kretschmar HA, Heckmann JG. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *Journal of neurology*. 2012;259(1):175-7.

236. Martinez-Garcia FA, Moreno-Docon A, Segovia-Hernandez M, Fernandez-Barreiro A. [Deafness as a sequela of Toscana virus meningitis]. *Medicina clinica*. 2008;130(16):639.

237. Zanelli G, Bianco C, Cusi MG. Testicular involvement during Toscana virus infection: an unusual manifestation? *Infection*. 2013;41(3):735-6.

238. Kuscu F, Menemenlioglu D, Ozturk DB, Korukluoglu G, Uyar Y. [Acute Toscana virus infection in an anti-HIV positive patient]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48(1):168-73.