

Arbovirüs Enfeksiyonlarında Tanı İlkeleri

Prof. Dr. Demir SERTER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Arbovirüsler, doğada yaygın olarak bulunan, çeşitli familya ve genoslara ait en az 550 virüsten oluşan heterojen bir gruptur (1). Modern virolojide her ne kadar bu virüsler, ait oldukları virüs familyalarının kapsamında ve birbirlerinden bağımsız olarak incelenmekte ise de, aralarındaki ortak epidemiyolojik ve işlevsel özelliklerin yanı sıra, neden oldukları insan

hastalıklarının ortak klinik özellikleri, hâlâ bu etkenlerin “Arbovirüs grubu” başlığı altında benimsenmelerine neden olmaktadır (1-4). Tablo-1’de insan hastalıklarıyla ilişkili bazı arbovirüsler görülmektedir (2,4). Tabloda koyu renk olarak gösterilen virüsler ülkemizde bulunan arbovirüslere örnektir.

Tablo 1. Bazı arbovirüslerin taksonomik özellikleri

Taksonomik Sınıflama	Önemli Arbovirüsler
Togaviridae Genus Alphavirus	Chikungunya, Mayaro, O’Nyong-nyong, Ross Nehri, Semliki Ormanı, Sindbis, Venezuela, doğu ve batı beygir ansefaliti virüsleri
Flaviviridae Genus Flavivirus	Brezilya ansefaliti (Rocio virüsü), dang, Ilheus, Japon B ansefaliti, Kysanur Ormanı hastalığı, louping ill, Murray Vadisi ansefaliti, Omsk hemorajik humması, Powassan, St.Louis ansefaliti, kene kaynaklı ansefalit , Rus ilkbahar-yaz ansefaliti, Batı Nil humması , sarı humma ve Zika virüsleri
Bunyaviridae Genus Bunyavirus	Anofel A ve B, California ansefaliti, Bunyamwera, Guama, Simbu, La Crosse ve Turlock virüsleri
Genus Phlebotomus	Tatarcık (Phlebotomus) humması , Rift Vadisi humması ve Turlock virüsleri
Genus Nairovirus	Kırım-Kongo hemorajik humması , Nairobi koyun hastalığı ve Sakhalin virüsleri
Reoviridae Genus Orbivirus	Afrika at hastalığı, Mavi dil virüsü
Genus Coltivirus	Colorado kene humması virüsü
Rhabdoviridae Genus Vesiculovirus	Hart Parkı, Kern Kanyonu ve veziküler stomatit virüsleri

Arboviral infeksiyonların büyük bir bölümü asemptomatiktir. Belirtili seyreden infeksiyonlar ise, (1) döküntülü veya döküntüsüz, ateş ve genel sistemik belirtilerle seyreden iyi

huyulu hastalık, (2) yüksek mortalite riski taşıyan ansefalit ve (3) hemorajik hummalar olmak üzere, başlıca üç değişik hastalık tablosu şeklinde olmaktadır (2,4,7).

Tanıda Kullanılan Başlıca Yöntemler

1) Virolojik Yöntemler: Etkenin izolasyonuna yöneliktir ve başka bir deyişle, tanıda altın standarttır. Bu amaç için in vitro ve in vivo sistemler kullanılır. Arbovirüsler genellikle hastalığın ilk günlerinde, özellikle klinik belirtilerden evvel, kanda ve BOS'da (ansefalit virüsleri) bulunurlar. Ancak bu dönemdeki hastalara rastlamak ve materyal almak olanağının pek ele geçmemesi ve özellikle, bu materyallerde virüs miktarının az olması, izolasyon şansını çok güçleştirir. Bu nedenle, virüs izolasyonu daha çok ölümle sonuçlanan olgularda, beyin veya medülladan alınan örneklerle yapılır. Materyal uygun in vitro (hücre kültürü) ve in vivo sistemlere, özellikle de yeni doğmuş beyaz farelere beyin içi yoldan inoküle edilir. Bir etken izole edilir ise, serolojik testlerin yardımı ile ve eldeki bilinen antiserumların aracılığı ile virüsün kesin idantifikasyonu yapılır (2,4,8,9).

a) Hücre kültürü sistemleri: Tüm arbovirüslerin üreyebileceği universal bir in vitro sistem bulunmamaktadır. Bu nedenle, etken izolasyonu girişimlerinde epidemiyolojik, anamnestik ve klinik veriler çok önemlidir. Örneğin, sivrisineklerin görüldüğü bölge ve mevsimlerde, açıklanamayan ateş, ansefalit ve/veya menenjit veya gevşek paralizisi belirtileri gösteren olgularda Batı Nil Humması (BNH)'ndan kuvvetle kuşkulmalıdır (2,8,10). Yerel veya bölgesel olarak Batı Nil Virüsü (BNV)'nün enzootik aktivitesini destekleyen kanıtlar varsa veya insan olguları görülüyorsa ya da hasta, BNH'nin görüldüğü bölgelere yakın zamanda seyahat etmiş ise, BNV'ye bağlı bir infeksiyon akla gelmelidir. Zira ancak bu verilerin ışığında kuşkulanan virüslerin üreyebilecekleri hücreleri seçmek mümkün olur.

Etken izolasyonu için primer ve sürekli hücre dizinleri kullanılabilir. Cıvcıv veya ördek embriyonu ve hamster böbrek hücrelerinden hazırlanan hücre kültürleri duyarlı ve çok kullanılan primer hücre sistemleridir. Vero hücreleri (yeşil maymun hücreleri), BHK-21 (yavru hamster böbrek hücreleri) hücrelerinin yanı sıra sivrisinek hücrelerinden hazırlanan (örn., Aedes albopictus ve A.aegypti) gibi hücre türleri ise çok kullanılan sürekli hücre dizinlerine örnektir. Tiplerine göre değişmek üzere arbovirüsler, primer hücre sistemlerinde sitopatik etki, sürekli hücre dizinlerinde ise plâk oluşturarak ürerler (11-13).

b) Yeni doğmuş farelere inokülasyon: Bir günlük fare yavruları, özellikle ansefalit yapan virüslerin izolasyonunda çok kullanılan ve bir anlamda universal bir in vivo sistemdir. Beyin içi yolla materyalin inokülasyonunu izleyen birkaç gün gibi kısa bir kuluçka döneminden sonra hastalık veya felç belirtileri gösteren fareler itlâf edilir, beyinlerinden %1-10'luk süspansiyonlar hazırlanır. Bunlar eldeki poli- ve monoklonal serumlarla karşılaştırılarak idantifikasyon gerçekleştirilir (2,4,8,9).

2) Serolojik Yöntemler: Kolay ve ekonomik oldukları gibi, çabuk sonuç verirler ve pratikte çok kullanılırlar. Hemagglütinasyon önlenim (HAÖ), kompleman birleşmesi (KB), poli/monoklonal antikor kullanılarak yapılan

immüno Floresans (İF), enzim immün essey (EİA) ve nötralizasyon testleri eskiden beri kullanılan klâsik yöntemlerdir ve hâlâ değerlerini korumaktadır. Serolojik yöntemlerin en önemli dezavantajı, aynı antijenik grupta bulunan virüsler arasında (örn., flavirüsler) çapraz reaksiyonların görülmesidir (2,8,14,15). Hemagglütinasyonu önleyen antikorlar en çok çapraz reaksiyonlara neden olan, nötralizan antikorlar ise en özgül olanlardır. Bir başka deyişle, testler arasında en özgül olanı nötralizasyon, en az özgül olanı da HAÖ testidir.

Nötralizan ve hemagglütinasyonu önleyen antikorlar, hastalığın başlangıcından hemen sonraki birkaç gün içinde (IgM tipinde) serolojik yöntemlerle saptanabilecek düzeydedir. Hastalığın ilerleyen günlerinde, IgG tipi antikorların da katılımıyla, toplam antikor düzeyi yükselir ve 4. ayda maksimum düzeyi bulur. IgM tipi antikorlar en geç 4-6 ay içinde kaybolurlar; IgG'ler ise 1-2 yıl bu düzeyde kaldıktan sonra, titreleri düşmekle birlikte kanda uzun seneler, hatta ömür boyu devam ederler. KB antikorlarının ömrü en fazla 2-5 yıldır (2,8,9,14).

Konvansiyonel yöntemler aracılığıyla, hastaya ait çift serum ile yapılan serolojik testler arboviral infeksiyonların tanısında çok kullanılır. Akut ve iyileşme dönemlerinde alınan (10-15 gün ara ile) hasta kanlarında serokonversiyonun (4 misli titre artımı) saptanması tanıyı kesinleştirir.

Diğer taraftan, elde uygun antijenler varsa EİA yöntemiyle özgül IgM ve IgG tipi antikorları aynı anda saptamak ve bu sayede kısa sürede tanıyı kesinleştirmek, birçok arbovirüs infeksiyonunda olasıdır. Ancak bu yöntemde de grup içi çapraz reaksiyonlar serolojik tanıda bazı sorunlara yol açabilmektedir (2,8,14).

Bir başka önemli nokta, uygun klinik belirtilerle birlikte, hastalığın başlangıç döneminde, kanda veya BOS'da, sadece IgM tipi antikorların saptanması olumlu bir bulgu ise de tam güvenilir değildir. Zira, bilindiği gibi IgM türü antikorlar, infeksiyondan sonra bazen 6 ay süre ile hasta kanında varlıklarını sürdürürler. Eğer hasta, son 6 ay içinde aynı virüs ile bir infeksiyon geçirmişse ve başvuru nedeni hastalık, kuşkulanan virüs dışında bir etken ile oluşmuş ise, test sonuçlarının yanıltıcı olacağı açıktır (2,8,9,14,16).

Ansefalit olgularının erken serolojik tanısında EİA yöntemi ile hem hasta serumunda hem de beyin omurilik sıvısında (BOS) antikor (IgM) aramak olasıdır (2,17,18). EİA yöntemiyle BOS'taki IgM tipi antikorların saptanması, başta beyin dokusu olmak üzere bir santral sinir sistemi infeksiyonuna ve yerel antikor yapımına işaret eder. Ancak saptanacak pozitif bir sonuç güvenilir değildir; sadece bir fikir verir ve muhakkak bu sonucun hastalığın daha ileri döneminde serokonversiyon ile doğrulanması gereklidir.

3) Diğer Yöntemler: İmmünohistokimyasal, nükleik asit hibridizasyonu ve özellikle revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ve nükleik asit dizinlemesi de arboviral infeksiyonların tanısında son yıllarda yararlanılan yöntemler arasına girmiştir. Özellikle RT-PZR yöntemi, erken tanı ve

etkene ilişkin ayrıntılı bilgi edinilmesine olanak tanınmasına karşın, kısıtlı sayıdaki referans merkezlerinde yapılabilmektedir; kitlerinin ticari olarak temin edilememeleri, yöntemin en önemli dezavantajıdır (2,8,9,19). Diğer taraftan, etiyojinin saptanamadığı durumlarda, PZR yöntemiyle, Batı Nil, HSV veya enteroviral infeksiyonları dışlayabilmek olasıdır.

Beyinden yapılan ince kesitlerde, immüno Floresans yöntemi ile viral antijeni görmek mümkündür (2,8,11).

Sonuç

Epidemiyolojik, klinik ve fiziksel verilere dayanılarak arbovirüs infeksiyonlarının tanısında izlenecek yolu aşağıda olduğu gibi özetlemek olasıdır:

1) Arboviral infeksiyonlarda periferik kan tablosunda pek fazla bir değişiklik yoktur; hafif bir lökositoz veya lökopeni, lökosit formülünde segment egemenliği veya rölatif lenfomonositoz olabilir. Eritrosit sedimentasyon hızı ve CRP değerlerindeki artışlar yeterli bir fikir vermezler. Trombositopeni de sık görülen bir bulgudur; hastaların çoğunda ALT ve AST düzeylerinde ılımlı (normalin 2-5 misli) bir yükselme görülebilir.

2) Ansefalit belirtileri gösteren hastalarda BOS'un incelenmesi önemlidir. Punksiyon lomber yapıldığında likörün berrak veya hafif bulanık, basıncının artmış olduğu görülür. Pandy reaksiyonu orta derecede pozitif, protein miktarı %50-100 mg arasında, şeker ve klorür genellikle normal sınırlardadır. Önemli olarak hücre sayısında bir artış vardır; çoğu lenfomononükleer seriye ait olan lökositlerin sayısı 50-2000/mm³ arasında değişebilir.

3) Dünyanın her yerinde olduğu gibi ülkemizde de arbovirüslerin neden oldukları ansefalitlerin özgül tanımlarında sorunlar yaşanması doğaldır. Bu bağlamda, yukarıda değindiğimiz inceleme yöntemlerini CDC'nin tanı kriterleriyle birleştirdiğimizde, aşağıdaki hususlar tanıda yardımcı olacaktır:

a) BOS'ta veya hasta kanında sadece IgM tipi antikorların saptanması (en azından serokonversiyon ile teyit edilmesi gerekli),

b) Akut ve iyileşme dönemlerine ait serumlarda 4 misli titre artımı (HA-Ö veya nötalizasyon testiyle serokonversiyonun görülmesi),

c) Olanaklar elverişli ise BOS, kan veya dokulardan virüs izolasyonu, viral antijen saptanması veya viral genomik dizinlerin saptanması (16,17).

KAYNAKLAR

1. Karabatsos N. *International catalogue of arthropod-borne viruses*. 3rd ed. San Antonio (TX): American Society for Tropical Medicine and Hygiene; 1985.
2. Serter D. *Virüs, Riketsiya ve Klamidy Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitapevleri, 1997, s.252.
3. Casals J. *Incorporation of the viruses registered in the catalogue in the general system of classification of viruses adapted by the international committee for the nomenclature of viruses (ICNV)*. Report to the members

of the SIRACA. August 5, 1974.

4. Theiler M, Downs WG. *The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates*. Yale Univ Press. New Haven and London, 1973.

5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz, Melnick & Adelberg's *Medical Microbiology*. 23rd ed. The McGraw-Hill Com. 2004. s.514.

6. Johnston RE, Peters JC. *Alphaviruses*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). In: *Fields Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers; 1996. s.843.

7. Markoff L. *Alphaviruses*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2005. s.1913.

8. Monath TP, Heinz FX. *Flaviviruses*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). In: *Fields Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers; 1996. s.961.

9. Tsai TF, Vaughn DW, Solomon T. *Flaviviruses* In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 2005. s.1926.

10. Sejvar, JJ, Bode, AV, Marfin, AA, et al. *West Nile virus-associated flaccid paralysis*. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1021.

11. Buckley SM, Clarke D. *Differentiation of group A arboviruses Chikungunya, Mayaro and Semliki Forest by the fluorescent antibody technique*. *Rep from Proc Soc Exp Biol and Med*; 135:2,1970.

12. Buckley SM. *Susceptibility of the Aedes albopictus and A.aegypti cell lines to infection with arboviruses*. *Rep from Proc Soc Exp Biol and Med*, 131:625-630, 1969.

13. Buckley SM. *Applicability of the HeLa(Gey) strain of human malignant epithelial cells to the propagation of arboviruses*. *Rep from Proc Soc Exp Biol and Med*, 116:345-358, 1964.

14. Johnson, BW, Kosoy, O, Martin, DA, et al. *West Nile virus infection and serologic response among persons previously vaccinated against yellow fever and Japanese encephalitis viruses*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5:137.

15. Vaughn, DW, Green, S, Kalayanarooj, S, et al. *Dengue in the early febrile phase: Viremia and antibody responses*. *J Infect Dis* 1997; 176:322.

16. Holzmann, H. *Diagnosis of tick-borne encephalitis*. *Vaccine* 2003; 21 Suppl 1:S36.

17. Monath, TP, Nystrom, RR, Bailey, RE, et al. *Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis*. *J Clin Microbiol* 1984; 20:784.

18. Martin, DA, Noga, A, Kosoy, O, et al. *Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:1130.

19. Johnson, AJ, Karabatsos, N, Lanciotti, RS. *Detection of Colorado tick fever virus by using reverse transcriptase PCR and application of the technique in laboratory diagnosis*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1203