T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI
VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) HASTALARINDA TİP I (α, β) İNTERFERON VE VİRAL YÜK ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

DR.İbrahim BÜYÜKHAN

UZMANLIK TEZİ

SİVAS
2012

T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI

VE

KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) HASTALARINDA TİP I (α, β) İNTERFERON VE VİRAL YÜK ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

DR.İBRAHİM BÜYÜKHAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MEHMET BAKIR

SİVAS

2012

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. Mehmet BAKIR

Üye: Doç. Dr. Aynur ENGİN

Üye: Yard. Doç. Dr. M. Gökhan GÖZEL

Bu tez,..... tarih ve ..... sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gökhan KÖYLÜOĞLU
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim esnasında bana emeği geçen Enfeksiyon Hastalıkları alanında deneyim ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet BAKIR'a, değerli hocalarım sayın Prof. Dr. İlyas DÖKMETAŞ'a, sayın Prof. Dr. Nazif ELALDI'ya, sayın Doç. Dr. Aynur ENGİN'e ve sayın Yard. Doç. Dr. M. Gökhan GÖZEL'e teşekkür ederim. Tezimle ilgili çalışmalarda benden yardımını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Zeynep SÜMER'e ve sayın Yard. Doç. Dr. Ziynet ÇINAR'a teşekkür ederim. Ayrıca ihtisas süresi boyunca hiçbir zaman sabrını ve sevgisini benden esirgemeyen sevgili eşim Şükran BÜYÜKHAN'a ve çocuklarım Muhammed Talha, Emir Musap ve Zeynep Nurvera' ya teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalarında
Tip I (α, β) İnterferon ve Viral Yük Arasındaki İlişkinin Araştırılması
DR. İbrahim BÜYÜKHAN
Tıpta Uzmanlık Tezi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
SİVAS-2012

Bu çalışmada KKKA hastalarında tip I interferon (IFN-α ve IFN-β) seviyeleri, viral yük seviyeleri, viral yük ve tip I interferonlar arasındaki ilişki, interferon seviyeleri ile hastalığın şiddeti ve mortalite arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu çalışmaya Nisan-2010-Eylül-2011 tarihleri arasında KKKA hastalığı tanısı alan 100 erişkin hasta ve kontrol grubu olarak da herhangi bir şikayeti bulunmayan 74 sağlıklı birey seçilmiştir. Hastalardan, ilk örnek başvuru anında, ikincisi yatışının 5. gününde olmak üzere iki kez kan örneği alındı. Hasta serumlarındaki IFN-α ve IFN-β seviyeleri ELISA yöntemi ile, viral yük seviyeleri ise Real-Time PCR yöntemi ile çalışıldı. Hasta grubundaki bireyler, Swanepoel ve arkadaşlarının tanımladığı kriterlere göre ağır(grup1) ve hafif(grup2) hasta olarak sınıflandırıldı. Takibi sırasında ağır gruptaki hastalardan 25'i kaybedildi. Ağır grupta olup ölen hastalar grup1a ve ağır grupta olup yaşayan hastalar ise grup1b olarak adlandırıldı.

Çalışmamızda KKKA hastalarının INFα ve β düzeyleri kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$). Çalışmamızda grup1'deki olgularda tespit edilen IFN-α ve IFN-β seviyeleri grup2 ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Aynı şekilde, grup1a ve grup1b'deki IFN α ve IFN β seviyeleri grup2 ve kontrol grubundaki IFN α ve IFN β seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$).

Grup1 ile grup2'deki hastalarda tespit edilen viral yük seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel fark önemsiz bulundu ($p>0,05$). Grup1a ile grup1b'deki olgularda tespit edilen viral yük seviyesini kıyasladığımızda fark önemli bulundu ($p<0,05$). Aynı şekilde grup1a'daki hastaların viral yük seviyesi grup2'de yer alan hastalardan anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Hastaların ilk kan örneklerinde saptanan interferon α düzeyleri bakımından yapılan ROC analizinde mortaliteyi tahmin etmek için cut off değeri 250,42 pg/ml bulundu. Bu analizde IFN-α için eğri altında kalan alan 0.713 ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). IFN-α'nın sensitivitesi %64, spesifitesi ise %26.7 olarak saptandı. IFN-β için belirlenen cut off değeri 475,95 pg/ml, eğri altında kalan alan 0.607 ve istatistiksel olarak önemli değildi ($p>0,05$). Viral yük için bulunan cut off değeri 84455,00 kopya/ml, eğri altnda kalan alan 0,870 ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). Viral yükün sensitivitesi %88, spesifitesi ise %22,7 olarak bulunmuştur.

Grup1a'daki olgularda IFN-α ile IFN-β arasında anlamlı ve pozitif yönlü bir korelasyon varken ($r=0.551$, $p<0.05$), grup1b ve grup2'deki olgularda IFN-α ile IFN-β arasında negatif yönlü korelasyon vardı ve fark önemsizdi ($p>0.05$). Grup1a ($r=0.032$), grup1b ($r=0.310$) ve grup2'de ($r=0.389$) viral yük ile IFN-α arasında pozitif yönlü fakat anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir korelasyon vardı. Viral yük ile IFN-β arasında grup1a ($r= -0.030$) ve grup1b'deki ($r= -0.229$) olgularda negatif, grup2 olgularında ise pozitif ($r= 0.117$) yönlü fakat anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir korelasyon vardı.

Sonuç olarak, biz bu çalışmada KKKA hastalarında interferon ve viral yük seviyelerini yüksek bulduk. Bu durum bize KKKA hastalarında yüksek seviyede interferon salındığını ancak salgılanan interferonun viral replikasyonu yeterli bir şekilde önleyemediğini düşündürmüştür. KKKA virüsünün interferonun etkisinden kurtulmak için çeşitli kaçınma mekanizmalarına sahip olması muhtemeldir. Bu durumun netleştirilmesi/kesinleştirilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo Kanamalı Ateş, interferon α, interferon β, viral yük

ABSTRACT

Investigation of the Relationship between Type I (α, β) Interferon and Viral Load in Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF)

In this study, type I interferon (IFN-α and IFN-β) levels in patients with CCHF, viral load levels, relationship between viral load and type I interferons, and whether there is a relationship between interferon levels and severity of illness and mortality have been investigated.

A hundred adult patients diagnosed as CCHF between April 2010-September-2011 and as control group, 74 healthy subjects who have any complaint were selected for the current study. Blood samples were taken from patients two times, the first sample on admission and the second sample fifth day of admission. IFN-α and IFN-β and viral load levels in patient's serum were assayed by ELISA and real-time PCR method, respectively. Individuals in the patient group were classified as severe (group 1) and mild (group 2) patients according to the criteria described by Swanepoel et al. During follow-up, 25 patients died in the severe group. Died patients and living patients who are in the severe group are called as grup1a and grup1b respectively.

In our study, INF-α and β levels of CCHF patients were significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$). IFN-α and IFN-b levels detected in grup1patients were found as significantly higher than that of grub 2 and the control group ($p < 0.05$). Similarly, IFN-α and IFN-β levels of group1a and group1b were significantly high compared to IFN-α and IFN-β levels of control group and group 2 ($p < 0.05$).

When viral load levels were compared between group 1 and group 2, statistical difference was insignificant ($p > 0.05$). When viral load levels were compared between group 1a and group 1b, statistical difference was significant ($p < 0.05$). Similarly, viral load levels of grup1a patients were significantly higher than group2 patients.

In the ROC analysis which is carried out in terms of the interferon-α levels detected in first blood samples of patients, cut-off value, used for to predict the mortality, was determined as 250.42 pg/ml. In this analysis, the area under the curve for IFN-α was 0.713 and was statistically significant ($p < 0.05$). IFN-α sensitivity and specificity was detected as 64% and 26.7%, respectively. Cut-off value determined for IFN-β was 475.95 pg/ml, area under the curve was 0. 607 and it was not statistically significant ($p > 0.05$). The cut off value found for viral load was 84455.00 copies/ml, area under the curve was 0,870, and was statistically significant ($p < 0.05$). Viral load sensitivity and specificity were 88% and 22.7%, respectively.

When there was a significant and positive correlation between IFN-α and IFN-β levels in group1 cases ($r = 0.551$, $p < 0.05$), there was a negative correlation between IFN-α and IFN-β levels in group1b and group2 cases and the difference was statistically insignificant ($p > 0.05$). There was positive but insignificant correlation between viral load and IFN-α in group1a ($r = 0.032$), group1b ($r = 0.310$) and group2 ($r = 0.389$). Between viral load and IFN-β, there was a negative correlation in group1a of ($r = -0030$) and group1b ($r = -0\ 229$) and there was positive but insignificant correlation in group 2 ($r = 0\ 117$) patients ($p > 0.05$).

As a result, in this study we found high levels of interferon and viral load in patients with CCHF. This suggests to us that high levels of interferon are secreted in patients with CCHF but secreted interferon cannot adequately prevent viral replication. It is probable that CCHF virus has various avoidance mechanisms to escape the effects of interferon. Further studies are needed to clarify this situation.

Keywords: Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, interferon-α, interferon-β, viral load

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....i
ÖZET.....ii
ABSTRACT.....iii
İÇİNDEKİLER.....iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....vi
ŞEKİLLER.....ix
TABLOLAR.....x
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER.....2
2.1.Tanım.....2
2.2. Etken.....2
2.3. Epidemiyoloji.....3
2.4. Virüs Mikrobiyolojisi.....5
2.5. Risk Gruplar.....7
2.6. Bulaşma.....7
2.7. Klinik Bulgular ve Hastalığın Seyri.....8
2.8. Patogenez.....9
2.9. Laboratuar Bulguları.....12
2.10. Tanı.....13
2.11. Ayırıcı Tanı.....14
2.12. Tedavi.....14
2.12.1. Destek Tedavisi.....14
2.12.2. Antiviral Tedavi.....14
2.12.3. Diğer Tedavi Seçenekleri.....16
2.13. Korunma ve Kontrol.....16
3. KKKA ve İNTERFERONLAR.....17
3.1. Doğuştan Gelen Bağışıklık Yanıtları.....17
3.2. İnterferonlar.....18
3.3. İnterferon Sentezi ve KKKA Virüsünün İmmün Sistemden Kaçışı.....24
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....27
4.1. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi.....27

4.2. ELISA Yöntemiyle IFN-α Çalışılması.....28
4.2.1. Ayıraçların Hazırlanması.....28
4.2.2. Çalışma Yöntemi.....28
4.3. ELISA Yöntemiyle IFN-β Çalışılması.....29
4.3.1. Ayıraçların Hazırlanması.....29
4.3.2. Çalışma Yöntemi.....30
4.4. PCR Yöntemiyle Viral Yük Tespit Yöntemi.....31
4.4.1. Serumdan DNA/RNA İzolasyonu..... 31
4.4.2. Real Time PCR Reaksiyonu.....31
4.4.2.1 Çalışma Prensibi.....32
4.4.2.2. Çalışma Protokolü.....32
4.4.3. Kullanılan Solüsyonlar ve PCR'ın Hazırlanması.....33
4.4.3.1. PCR'ın Hazırlanması.....34
4.4.3.2. Fluorion Deteksiyon Sistemi'nin Programlanması.....34
4.5. Veri Analizi.....35
4.6. İstatistiksel Analiz.....35
5. BULGULAR.....36
6. TARTIŞMA.....48
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....62
8. KAYNAKLAR.....64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAR 1: RNA spesifik adenosin deaminaz 1

ALT: Alanine aminotransferase

aPTT: activated Partial thromboplastin time

ARDS: Adult respiratuar distres sendromu

AST: Aspartate aminotransferase

BSL: Biyogüvenlik düzeyi

BUN: Kan üre azotu

CCHF: Crimean-Congo hemorrhagic fever

CCHFV: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus

CPK: Creatine phosphokinase

CRP: C-reactive protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

DİC: Dissemine intravasküler koagülopati

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ds RNA: Çift Zincirli RNA

EIA: Enzyme Immune Assay

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ER: Endoplazmik Retikulüm

ESH: Eritrosit sedimantasyon hızı

FDA: Food and Drug Administration (ABD)

FDP: Fibrin degradation products

FDP. Fibrin yıkım ürünleri

GC : Gc gliloproteini

GGT: Gama glutamiltransferaz

Gn : Gn glikoproteini

HCV: Hepatit C virus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IFA: İndirect fluorescent antibody

IFN: İnterferon

IgA: Immunglobulin A

IgG: Immunglobulin G

IgM: Immunglobulin M

INR: international normalized ratio

IL : İnterlökin

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

IRF: IFN düzenleyici faktör

ISG: IFN ile Uyarılmış Genler

2-5 OAS: 2 '5' oligoadenilat sentetaz

KKKA: Kırım-Kongo kanamalı ateşi

LDH: Lactate dehydrogenase

L genom segment : Büyük RNA segmenti

MDA-5: Melanoma Diferansiyonu ile ilişkili gen-5

MDCs: Miyeloid Dendritik Hücreler

M genom segmenti: Orta büyüklükteki RNA segmenti

NK: Doğal Öldürücü Hücre

NP: Nucleocapsid proteini

NSD: Nairobi Sheep Disease virüs

OR: Odd's oranı

PAI: Plazminojen aktivatör inhibitörü

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

pDC: plazmositoid dendritik hücreler

PKR: Protein kinaz R

PT: Protrombin zamanı

RIG-1: Retionik asid indükleyen gen-1

RNA: Ribonükleik asit

RSV: Respiratory syncytial virus

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RVFV: Rift Valley ateşi virüsünün

SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome

SD: Standard sapma

S genom segmenti: Küçük RNA segmenti

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

ssRNA: Tek iplikçikli RNA

STAT: Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatörü

JAK: Janus kinaz

TDP: Taze donmus plazma

TLR: toll-like reseptör

TNF-α: Tümör nekroze faktör-α

Ub: Ubiquitin

YDP: Yaygın damar içi pıhtılaşması

VKA: Viral kanamalı Ateşi

YDP: Yaygın damariçi pıhtılaşması

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. CCHFV virionun şematik çizimi.….....6
Şekil 3.1.Viral enfeksiyonun tanınması için iki ana yolun şematik özeti, RIG-I/MDA5 ve TLR yolları ve FN-β promoterin indüksiyonu.....21
Şekil 3.2 Tip I, II ve III IFN'ların Jak-Stat Sinyalizasyon yolakları.....23
Şekil 3.3. TipI IFN'ların bir viral enfeksiyonu takiben oluşan indüksiyon, sinyalizasyon ve aksiyonu.Viral nükleik asitlerin RIG-I/MDA5, PKR ve TLR yolakları tarafından intra-ve ekstraselüler olarak tanınması.....27
Şekil 5.1. İnterferon-α ROC analizini gösteren şekil.....45
Şekil 5.2. İnterferon-β ROC analizini gösteren şekil.....45
Şekil 5.3. Viral yük ROC analizini gösteren şekil.....46

TABLOLAR

Tablo 5.1. Çalışmaya alınan hastaların yaş, cinsiyet, ortalama hastaneye yatmadan önceki hastalık süresi ve bazı ortalama laboratuar parametrelerin karşılaştırılması. 37

Tablo 5.2. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (grup1-grup2) ait bulgu ve belirtilerin karşılaştırması.....38

Tablo 5. 3. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (grup1a, grup1b ve grup2) ait yaş, cinsiyet ve laboratuar değerlerinin karşılaştırılması 39

Tablo 5.4. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (grup1a, grup1b ve grup2) ait bulgu ve belirtilerin karşılaştırılması.....40

Tablo 5.5. Grup1 ve grup2 hastaların ve kontrol grubunun birinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerin karşılaştırılması..... 41

Tablo 5.6. Grup1a, gru1b ve grup2 hastaların birinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerin karşılaştırılması.....42

Tablo 5.7. Tablo 5.7. Grup1a, grup1b ve grup2 hastaların ikinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve yükleri karşılaştırılması.....43

Tablo 5.8. Tablo 5.8. Grup1b ve grup2 hastaların birinci-ikinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerinin karşılaştırılması..... 44

Tablo 5.9. Tablo 5.9. Ölen hastaların birinci kan örneklerinin ROC analizinin karşılaştırılması.....46

1.GİRİŞ-AMAÇ

Son on yılda, toplum kaynaklı veya hastane kaynaklı Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü (CCHFV) ile giderek artan sayıda salgınlar görülmüştür. CCHFV'nün biyoterörizm ajanı olarak olası kullanımı, insandan-insana bulaşma kapasitesi, aşı ve iyi bir antiviral tedavinin olmayışı gibi faktörler halk sağlığı açısından bu virüsü önemli bir patojen yapmaktadır. CCHFV'nü içeren örneklerin taşınması için yüksek seviyede güvenlik önlemlerinin alınması ve virüs çalışmaları içinde güvenlik seviyesi BSL-4 olan laboratuarların kullanılmasını gerektirir. Tüm bu zorluklar virüsün yeterli düzeyde araştırılmasını engellemektedir (90). KKKA hastalığı ve benzeri virüslerin oluşturduğu bu hastalıklara toplu olarak Viral Kanamalı Ateş (VKA) hastalığı adı verilmektedir (1).

Viral kanamalı ateş terimi coğrafik olarak sınırlı çok sayıda virüs ile ilişkili hastalıkları yansıtmaktadır. Bu hastalıklar ağır klinik seyri olan, insanlarda farklı virüsler tarafından oluşturulan, mortalitesi yüksek olan, ateş, şiddetli olgularda kanama ve şok ile karakterli bir sendromdur. Günümüzde VKA oluşturan en az 14 farklı virüs, dört farklı aile içinde sınıflandırılmıştır: VKA oluşturan virüsler; Filoviridae (Marburg virus ve Ebola virus), Arenaviridae (Lassa virus ve Junin, Machupo, Sabia ve Guanarito virus), Bunyaviridae (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), Rift Valley fever virus ve Hantavirus) ve Flaviviridae (Yellow fever virus ve Dengue virus) gibi RNA virüsleridir (1,2).

KKKA'nın henüz özgül bir antiviral tedavisi bulunmamaktadır. Ribavirinin in-vitro çalışmalarda ve hücre kültürlerinde CCHFV replikasyonunu durdurduğu, hayvan deneylerinde enfekte farelerde virüs replikasyonunu azalttığı, ancak viremiyi önleyemediği, fakat organ patolojisini önleyebildiği gösterilmiştir (4,5).

Genel olarak bakıldığında viral hastalıkların genelinde devreye ilk olarak giren ve viremiye karşı koyan sistem doğal bağışıklık yanıttır. Virüsler organizmaya girdikten sonra ilk olarak uyarılan doğal bağışılık sistemi hümoral ve hücresel olmak üzere iki türde immün yanıt oluşturur. Doğal bağışık yanıt, konak dokularından interferon (IFN) salınımını kontrol eden genlerin düzenlenmesi ve tip I IFN (IFN-α ve IFN-β) salınmasını arttırarak virüslere karşı konakta ilk savunmayı oluşturan bir sistemdir. Bu araştırmada tip I interferonların KKKA hastalığındaki salınımı, hastalardaki viral replikasyonu engellemesi, viral yükü baskılaması ve virüsün konağa vereceği zararı engellemesi ile CCHF virüsü ile enfekte bireylerdeki hastalık şiddeti ve ölüm ile ilişkisinin olup olmadığını ortaya koymak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu olmak üzere yaklaşık otuz ülkede tanımlanmış ölümcül seyredebilen bir Viral Kanamalı Ateş (VKA) enfeksiyonudur (11). Virüs, Bunyaviridae ailesinin Nairovirus alt gurubuna dâhildir (10). Coğrafik yayılım olarak, kene ile bulaşan virüslerin içinde en geniş alana sahip olan VKA virüsüdür. Hastalığın yayılımı Hyalomma cinsi kenelerin bölgesel dağılımına uymaktadır (6).

Ülkemizde ilk kez 2003 yılında hastalığın varlığı kanıtlanmıştır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından Türkiye genelinde 2010 yılı itibariyle 5000 civarında KKKA vakası tespit edilmiş ve bu vakalarda ki ortalama mortalite oranı %5-10 civarında bulunmuştur (143). Bu verilere göre yıllar itibariyle tespit edilen KKKA vaka ve ölüm sayısında artış olduğu görülmüştür (68,12).

Hastalık başlıca Hyalomma cinsi kenelerle (özellikle H. marginatum marginatum) taşınmaktadır. Kene, memeliler üzerinde konakçı olarak iki yaşam döngüsüne sahiptir. Mayıs-Eylül ayları arasındaki yaz döneminde aktif olan kene henüz ergin değildir (13). Ergin keneler Mart ve Kasım ayları arasında hayvanlar üzerinde konaklar ve ilkbaharda aktif hale geçerler. Kenenin yaşam döngüsü mevsimsel iklim değişimlerinden etkilenmektedir.

2.1.Tanım

VKA grubu hastalıklar ağır klinik seyirli olabilen, ateş ve şiddetli olgularda şok ve kanama ile seyredebilen bir enfeksiyon hastalığı grubudur (93). VKA etkeni olan virüsler Flaviviridae, Filoviridae, Arenaviridae ve Bunyaviridae ailelerinde bulunmaktadır. Flaviviridae ailesinde Yellow Fever virüs, Dengue virüs, Kyasanur orman hastalığı, Omsk hemorajik ateşi ve Alkhumra hemorajik ateşi virüsleri; Filoviridae ailesinde Marburg ve Ebola virüsleri; Arenaviridae ailesinde ise Lassa, Junin, Machupo, Guanarito, Sabia virüsleri; Bunyaviridae ailesinde CCHFV, Rift Vadisi ateşi, Hantavirüs ve Garissa virüsü bulunmaktadır (18, 94). VKA etkenleri arasında yer alan Lassa, Marburg, Ebola ve CCHF virüslerinin kişiden kişiye geçiş ve bunun sonucunda da önemli salgınlar oluşturduğu bilinmektedir (93).

2.2. Etken

KKKA etkeni olan CCHFV, Bunyaviridae ailesinin Nairovirus grubuna mensup bir RNA virüsüdür. Virüs, insanlarda diğer VKA'lar gibi yaygın ekimoz, gastrointestinal ve genitoüriner kanamalar ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma ile

giden akut bir enfeksiyon hastalığı oluşturmaktadır (3). Bu virüslerin hepsi de tek zincirli RNA genomuna sahip, lipid zarflı ve değişik morfolojik görünüme sahiptir. VKA virüslerinin çoğu zoonotiktir. Yine bir çoğu da vektörler ile insanlara bulaşmaktadır (Rift valley fever virüs, CCHFV, Yellow fever virüs, Dengue virüs, Omsk hemorrhagic fever virüs, Kyasanur Forest disease virüs ve Alkhumra virüs), bir kısmında ise bulaşmada vektörler rol oynamamaktadır (Lassa virüs, Junin virüs, Machupo virüs, Guanarito virüs, Sabia virüs, Hanta virüsler, Marburg virüs ve Ebola virüs). Bu virüslerden Lassa, Ebola, Marburg ve CCHFV kişiden kişiye bulaşabilen virüslerdir (90). Bunyaviridae ailesi, serolojik ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı beş cins içerir. Bunlar Orthobunya virüs, Hanta virüs, Nairo virüs, Phlebo virüs ve Tospo virüstür. Nairo virüs cinsi virüsler, yedi alt gruba ayrılır (CCHF, Dera Ghazi Khan virüs, Hughes virüs, Nairobi Sheep Disease (NSD) virüs, Qualyub virüs, Sakhalin virüs ve Thiafora virüs grupları). Bu gruplar içinde hepsi de keneler ile bulaşan 34 farklı virüs bulunmaktadır. Bu 34 farklı virüsten insanlar için en önemli olanlar ve hastalık riski taşıyanlar CCHFV, NSD virüs ve Dugbe virüslerdir (7,25).

CCHFV, 100 nm büyüklüğünde, heliksel kapsidli, zarflı ve 3 segmentli, tek zincirli bir RNA virüsüdür. Bu virüsler 350 den fazla eklembacaklı yoluyla bulaşan büyük bir virüs ailesidir. Nairovirus alt grubu içinde çoğu kene ile bulaşan 34 farklı RNA virüsü tanımlanmış olup yakın zamanda hayvanlar arasında kene ile bulaşan ama insanlarda hastalık etkeni olup olmadığı bilinmeyen yeni bir RNA virüsü olan Kupe virüsü de tanımlanmıştır (113). Virüs, dezenfektanlara ve çevre şartlarına nispeten dayanıksız olup konak dışında yaşayamaz, kuru havada 56°C'de 30 dakikada, sodyum hipoklorit çözeltileri ve %2'lik glutaraldehit gibi dezenfektanlarla ve morötesi ışınlarla kolaylıkla inaktive olur. Kanda 40 °C'de 10 gün yaşayabilir. Hücre kültüründe üretilebilir (7).

2.3. Epidemiyoloji

KKKA hastalığı insanlarda şiddetli kanamalı ateşe neden olan zoonotik bir enfeksiyondur. KKKA ilk kez Tacikistan'da 12. yüzyılda yaşamış bir Tacik hekim olan İsmail el Curcani tarafından tanımlanmış, Özbekistan'da yöresel adı ile hastalık yıllarca Khungripta (kan alımı), Khunymuny (burun kanaması) ve Karakhalak (kara ölüm) gibi isimlerle anılmıştır. Hastalıkla ilgili ilk resmi kayıtlar II. Dünya Savaşı yıllarında 1944-1945 yılı yaz aylarında, Batı-Kırım steplerinde görülen ilk salgın Nazi işgalinden yeni kurtulan ve çoğunlukla ürün toplayan köylülere yardım eden Sovyet askeri personeli arasında görülmüş ve 200'den fazla kişi ölmüştür. O zamanlar hastalığın kene ile ilişkisi belirlenmiş ve hastalığa Kırım Kanamalı Ateşi adı verilmiştir. Daha sonra etken virüs akut hastalık tablosu bulunan insanlardan ve Hyalomma marginatum marginatum cinsi yetişkin kene ve larval formlardan

izole edildmiştir. Kongo virüsü ise 1956 yılında Zaire' de ateşli bir hastadan izole edilmiştir. Aradan geçen 11 yıldan sonra, 1967 yılında Simpson ve arkadaşları 5'i laboratuar kaynaklı 12 hasta tanımlamış ve hastalardan alınan kanın yenidoğan farelere inokülasyonu sonucu virüs izole edilmiştir. Aynı araştırıcılar 1956 yılında izole edilmiş olan virüs ile bu virüslerin aynı virüs olduklarını bildirmişlerdir. 1969 yılında da Kongo virüsü ile Kırım Kanamalı Ateşi virüslerinin biyolojik olarak benzer virüs olduğunun gösterilmesi üzerine hastalık bu yıldan itibaren KKKA, virüs de *CCHFV* olarak anılmaya başlanmıştır (15,16).

KKKA hastalığı günümüzde, Afrika, Asya, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da sıklıkla endemik olarak görülmektedir. Günümüze kadar eski Sovyetler Birliği, Bulgaristan, Pakistan, Irak, Dubai, Kuveyt, Birleşik Arap Emirlikleri, Büyük Sahranın güneyindeki Afrika ülkeleri ve Kuzey Batı Çin'de epidemiler yaptığı bildirilmiştir(15). 1970-2000 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti, Kongo, Burkino Faso Tanzanya, Senegal ve Moritanya, Irak, Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan ve Çin 'den bildirilmiştir. Türkiye'de ilk defa 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında başta Tokat, Sivas, Çorum, Amasya, Yozgat, Gümüşhane, Bayburt, Erzurum, Erzincan ve çevresi olmak üzere iç ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nin kuzeyi ile Karadeniz Bölgesi'nin güney kesimlerini kapsayan geniş bir coğrafi alanda kene teması öyküsü olan, ateş ve kanama ile seyreden bir salgın dikkati çekmiş, 2003 yılında da hastalığın KKKA olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra Kastamonu,Bartın, Ankara, Çankırı, Bolu, Balıkesir gibi illerde de vakaların ortaya çıkmasıyla hastalığın görüldüğü alan daha da genişlemiştir (16, 68). Yunanistan'da ilk olgu 2008 yılında bildirilmiştir (64,65).

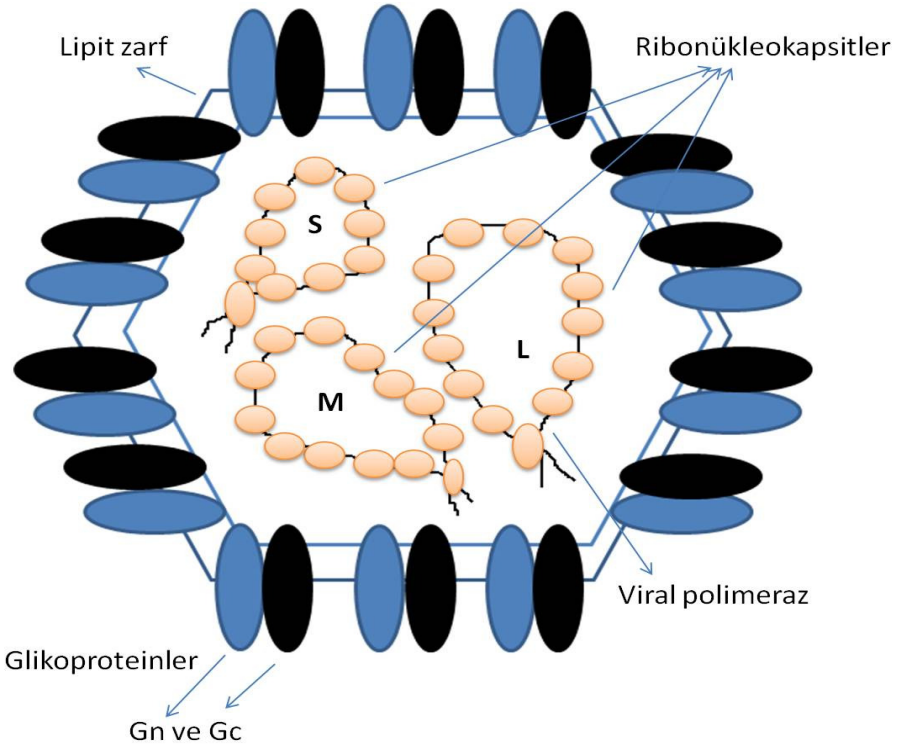
Cumhuriyet Üniversitesi Uygulama ve Araştırma hastanesi'ne ilk kez 2002 yılının Mayıs ayında Tokat yöresinden ateş, kas ağrıları, kanama gastrointestinal sistem yakınmalarıyla başvuran, lökopeni, trombositopeni ve karaciğer enzimlerinde yükseklik olan hastalar yatırılarak takip edilmiş ve bu hastaların bir kısmına sonradan serolojik olarak KKKA tanısı konulmuştur (69). Bakır ve ark.(70).'nın yapmış olduğu bir araştırmada Anadolu'nun merkezini ve doğusunu içine alan ve birbirine komşu olan 11 şehrin kırsal alanında vakalar görülmüş, bu olguların %80'nin Sivas, Tokat ve Yozgat illerinin kırsal bölgelerinden olduğu, vakaların Nisan ve Eylül ayları arasında görüldüğü bildirilmiştir. Olguların %90'ının çiftçi ve %60'ın da keneyle temas ve kene yapışma öyküsünün olduğu bildirilmiştir.

Hastalık mevsimsel özellik göstermektedir. Eski Sovyetler Birliği'nde Haziran ve Temmuz aylarında olgu sayısı açısından en yüksek seviyeye ulaşılmıştır. Güney Afrika Cumhuriyeti'nde olguların çoğu ilkbahar ve sonbaharda ortaya çıkmıştır. Genel olarak hastalığın Haziran-Eylül ayları arasında ortaya çıktığı bildirilmekte, ancak bu mevsimsel özelliğin bölgeye göre değiştiği ve Ocak ayında dahi olguların görülebildiği belirtilmiştir

(17,18). Bu duruma neden olarak ılık geçen kış ayları ile tarımsal aktivitelerin azalması sonucunda kene popülasyonunun artması ve keneler tarafından enfekte edilen göçmen kuşların ve memelilerin bölgesel hareketliliği sonucunda virüsün yayılması şeklinde bir öngörü ileri sürülmektedir (19). Ülkemizde 2002-2003 KKKA salgınının görülmesinden önceki yıllarda, Nisan ayında 5 °C'yi geçen gün sayısının ve Nisan ayındaki ortalama sıcaklığın giderek arttığı tespit edilmiştir (66). Genel olarak KKKA hastalığının Haziran ve Eylül arasındaki aylarda ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bununla birlikte hastalık, bölgeye göre değişebilmekte ve Ocak ayında da görülebilmektedir (67).

2.4.Virüs Mikrobiyolojisi

Viral glikoproteinlerin hedef hücrelerdeki reseptörü tanımak için önce reseptör aracılıklı endositoz yoluyla virüsü tanıdığına inanılmaktadır. KKKA virüsünün hücresel reseptörü henüz bilinmemektedir. CCHFV, Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs cinsinde yer alır. Bu grupta 34 adet virüs tanımlanmıştır. Virüs, zarflı, tek sarmallı, negatif polariteli, üç segmentli RNA virüsüdür. Çoğunlukla küresel yapıda 80-120 nm çapındadırlar. Üç segmentten oluşan viral genom, dört yapısal proteini kodlamaktadır. Her bir RNA segmenti ile birlikte virüse ait RNA'ya bağımlı RNA polimeraz da paketlenmiştir. Viral genomun L (large) segmenti RNA bağımlı RNA polimeraz'ı ve M (medium) segmenti, Gn ve Gc yüzey glikoproteinlerini, S (small) segmenti de N nükleokapsid proteinlerini kodlamaktadır (59,90), (Şekil 2.1.). Gn ve Gc glikoproteinlerinin duyarlı hücrelerde bulunan reseptör bölgelerini tanımaktan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Duyarlı olan hücrelerde reseptörlere bağlanan virüsler vezikül içerisinde, endositoz yoluyla hücre içerisine alınır. Virüsün replikasyonu sitoplazma içerisinde meydana gelir (6). Daha sonra vezikül içerisinde oluşan nükleokapsid vezikülden ayrılarak stoplazmada serbest hale gelir. Viral replikasyonu takiben, endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak ayrılırlar ve golgi bölgesinde sitoplazmik veziküller içine alınırlar. Gn golgi aygıtında, Gc ise endoplazmik retikulumda bulunur. Vezikül içindeki ortamın asitleşmesi sonucunda glikoproteinlerin üç boyutlu yapısında değişiklikler ortaya çıkar ve virüsle vezikül membranının füzyonu gerçekleşerek virüs en dıştaki zarını almış olarak hücre dışına çıkar (6). Nairovirüsler negatif polariteli kodlama sistemine sahiptirler. Viral RNA polimeraz çıplak haldeki RNA'yı kalıp olarak kullanamaz. RNA polimeraz konak hücre mRNA'larını kullanarak bu negatif polariteli viral genlerin mRNA'sını oluşturur. Bu mRNA'lardan da ilgili proteinler oluşur (57).



Şekil 2. 1. CCHFV virionun şematik çizimi.

Günümüzde virüslerin genetik farklılıkları nükleik asit sekans analizleri ile ortaya konulmuştur. Birçok nükleik asit sekanslama işlemlerinde S genom segmenti temel alınırken, yapılan son çalışmalarda M genomunun segmenti de sekanslanmaktadır. Artropodlar ile bulaşan RNA virüsleri genelikle daha az genomik değişkenlik gösterirler. Bunun nedeni bu virüslerin hem artropodlarda hem de omurgalılarda replikasyon kapasitelerini düşürmeden varlıklarını sürdürmek zorunda olmalarından kaynaklanır. CCHFV'nde ise bu durum beklenenden daha yüksek düzeydedir. En yüksek değişkenliğin glikoproteinleri kodlayan M segmentinde olduğu ve bu duruma rağmen proteinlerin işlevleri bakımından önemli olan bölgelerin korunduğu tespit edilmiştir. Genetik çeşitliliğin diğer bir nedeni, virüs genomunun üç segmentli olması nedeniyle genetik resortman oluşabilmesidir. Bu oluşum virüsün kenelerde gerçekleştirdiği koinfeksiyonlarla sağlanmaktadır. Kenelerde virüs varlığının uzun süre devam edebilmesi durumu, kenelerin birden fazla kökeni eşzamanlı olarak bünyesinde barındırma olasılığını kolaylaştıran bir faktör olabileceği düşünülmüş ve S ve M segmentlerinin filogenetik analizlerinde buna dair kanıtlar elde edilmiştir (60,61).

Yapılan filogenetik analizlerde genellikle S segmenti dizilerinin bir bölümü kullanılmaktadır. S segmentinde kodlanan ve 482 amino asitten oluşan Nükleokapsid proteini (NP) enfekte olmuş hücrelerde en çok bulunan proteindir. NP viral RNA ile etkileşir ve

birlikte ribonükleotidleri oluşturur. RNA ile NP etkileşimi tam olarak anlaşılmış değildir. Enfeksiyon sırasında; NP, aktin bağımlı native RNA segmentlerinin yokluğunda enfekte hücrelerin perinükleer bölgelerini hedefler (90). S segmentinin sekans analizi sonucu virüs farklı coğrafik dağılım gösteren 7 gruba ayrılmıştır. CCHFV'de Yunan suşu AP92 hariç düşük genetik farklılıkları nedeniyle Avrupa suşları aynı grupta yer almaktadır. Avrupa suşları güneydoğu Rusya ile benzer özellikler göstermektedir. Türkiye'de keneler ve hastalardan elde edilerek nüleotid dizileri saptanan KKKAV izolatlarına göre, sadece bir izolatın Avrupa 1 grubunda, diğer tüm izolatların Avrupa 2 grubu olarak adlandırılan Doğu Avrupa-Rusya suşları ile birlikte aynı grupta yer aldığı bildirilmiştir(11,61). Avrupa 1 grunda yer alan izolat, Midilli ve ark. (62)'nın yapmış olduğu bir çalışmada Kırklareli iline bağlı Bulgaristan sınırına yakın bir bölgede yaşayan hastadan elde edilmiştir. Virüsün M segment filogenetik analizlerine göre Türkiye, Rusya ve Kosova suşları ile birlikte grup 5'de yer almaktadır (63).

2.5. Risk Grupları

Hastalık için tarım çalışanları ve hayvancılık ile uğraşanlar (çiftçiler, veterinerler, hasta hayvan ile teması olanlar) ve akut hastalarla temas olasılığı olduğundan endemik bölgelerde görev yapan sağlık personeli, askerler, kamp yapanlar ile deri fabrikası işçileri yüksek risk altındadır. Epidemi sırasında evcil hayvanlar muhtemelen konak hacmini genişletmektedir (15, 17, 18, 22, 24).

2.6. Bulaşma

Hastalık, insanlara kenelerin kan emmesi ya da el ile ezilmesi, viremik hayvanların vücut sıvıları ve dokuları ile temas ve hasta insanların vücut sıvıları ile bulaşmaktadır. Epidemiolojik olarak en önemli bulaş yolu infekte kenelerin kan emmesidir (16, 71, 72). Keneler hastalığın doğadaki esas taşıyıcısı ve rezervuarı olarak kabul edilirler. Diğer rezervuarlar kirpi, domuz, fare, tavşan gibi vertebralı yabani hayvanlar ve kanatlılardır (16, 72). Virüs kenelerde ömür boyu (1-1,5 yıl), hatta nesiller boyu (transovaryal + transstadial geçiş) kalmakta ve çoğalabilmektedir. Evcil ve yabani hayvanlar ise virüsü ancak 7-10 gün kadar barındırabilmektedir. (20, 21, 57).

Virüs, birçok evcil ve yabani hayvanı enfekte etmektedir ancak bu hayvanlarda gelişen enfeksiyon hafif seyretmektedir. Bir çok kuş virüse karşı dirençlidir, fakat virüsün yayılmasında önemli rol oynarlar. KKKA'nın bulaşmasında Hyalomma cinsinden olan keneler daha önemli bir yere sahip olmakla birlikte, 34 civarında kene türünün bu hastalığı bulaştırabileceği bildirilmektedir (19). KKKA virüsü 34 kadar kene türünden izole edilmiştir ancak bu türler arasında bazı Hyalomma türleri özellikle de Hyalommma marginatum

marginatum en etkin biyolojik vektör olarak saptanmıştır. Bir kenenin gerçek anlamda vektör olarak kabul edilebilmesi için bunun larva ve/veya nimf döneminde kan emdiği viremik bir konaktan virüsü alabilmesi, gömlek değiştirme dönemlerinde bunu koruması ve bundan sonraki gelişme dönemlerinde bunu duyarlı başka konaklara verebilmesi gerekmektedir (transstadial geçiş). Aynı şekilde erişkin döneminde infekte konaklardan kan emen bir dişi kenenin virüsü alıp yumurtalarına aktarabilmesine transovarial geçiş denmektedir. Transovarial geçiş, aynı transstadial geçiş gibi vektörlük göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu kenelerin seçtikleri konakların da hastalık etkenlerini üreten ya da barındıran bir omurgalı olması gerekmektedir. Avrupa, Asya ve Afrika'da KKKA'nın görüldüğü yerler Hyalomma genusundan kenelerin dağılımı ile benzerlikler göstermektedir (3,11). H. marginatum marginatum aynı zamanda Akdeniz Hyalomması olarak da bilinmekte ve Avrupa'da görülen KKKA virüsünün ana vektörü olma özelliği taşımaktadır (2, 20, 57).

Kene tarafından ısırılan kişiler en önemli risk grubunu oluşturmaktadır. Endemik bölgelerde yasayanlar kenelerin yoğun olarak bulunduğu bölgelerden uzaklaşma, sık sık kene ısırıklarını kontrol etme gibi korunma önlemlerine uymalıdırlar. Veterinerler, mezbaha işçileri, hayvancılıkla uğraşanlar ve endemik bölgelerdeki hastanelerde görev yapan sağlık çalışanları risk altında bulunmaktadır. Özellikle ağız, burun, dişeti, vajina ve enjeksiyon yerinden kanaması olan hasta takibi sırasında infekte kanla karşılaşma sonucunda enfeksiyon riski %8,7, iğne batması durumunda risk %33 oranındadır. Perkütan yaralanma en yüksek bulaştırıcılığa neden olmaktadır. Anneden çocuğa geçiş de bildirilmiştir. Laboratuar çalışanlarının viral materyal ile temas sonucu virüsü alabildikleri bildirilmiştir (57).

2.7. Klinik Bulgular ve hastalığın seyri

KKKA virüsü, sadece insanda hastalık oluşturan virüs grubu içindedir. Virüsün oluşturduğu hastalığın klinik tablosu hafif, orta ve ciddi-ağır olmak üzere üç formda görülür. Klinik gidiş ise inkübasyon dönemi, prehemorajik dönem, hemorajik dönem ve konvalesan dönem olmak üzere dört fazdır. Hastalığın inkübasyon dönemi virüsün alınma yoluna ve alınan viral yüke göre değişkenlik göstermekle birlikte genellikle 1-3 gün, en fazla 9 gündür(57, 95, 96). Ergönül ve ark.(10)'nın yapmış odukları bir çalışmada, bu süre ülkemiz için ortalama 5,5 gün olarak bildirilmiştir. Kenelerden veya enfekte hayvanlardan insana bulaş olduğunda hastalığın inkübasyon süresi 2-5 gün kadardır, nozokomial enfeksiyonlarda ise inkübasyon süresi ortalama 4-9 gün olarak bildirilmekle birlikte minimum 2 günlük inkübasyon süresi bildirilen vakalar da vardır (31). İnkübasyon döneminden sonra hastalık kendini ani gelişen ateş, üşüme-titreme, baş ağrısı, kas ve sırt ağrısı ve eklem ağrıları ile gösterir. Bu şikâyetleri bulantı, kusma ve karın ağrısı takip eder. Ekstremitelerde görülen

dayanılamayacak tarzda şiddetli ağrılar olabilir. Bazı vakalarda diyare görülebilir. Konjunktiva tutulumu, yüzde ve boyun bölgesinde dikkati çeken kızarıklıklar olabilir. Bu şikâyetleri takiben önce sırtta başlayan, sonra tüm vücuda yayılan peteşiyal döküntüler görülür. Uvula ve sert damak civarında kanamalı enantemler görülebilir. Tüm vakaların yaklaşık %75'inde hastalığın 3 ile 7 nci günlerinde tipik kanama bulguları ortaya çıkar; burun, diş etleri, gastrointestinal sistem, akciğerler ve genitoüriner sistem kanamaları görülebilir. Tipik olarak kan alınan damar civarında yaygın ekimozlar oluşur ve bir miktar kan sızmaya devam edebilir. Bazı vakalarda çok yaygın purpurik döküntüler görülebilir. Hepatomegali veya splenomegali tespit edilebilir. Bazı hastalarda pulmoner ödem ve plevral efüzyonlar gelişebilir. Başlangıçta boyun ağrısı, huzursuzluk hissi, kişilik bozuklukları olabilir ve bu durum vakaların %10-25'inde ajitasyon veya depresyon, koma gibi giderek ciddileşen santral sinir sistemi bulgularına dönüşebilir özellikle bu vakalarda prognoz kötüdür. Santral tutulum menenjit ya da ensefalit tablosundan çok ensefalopati şeklindedir. Vakalarda görülen ölüm oranları %30-50'lere varabilir (96, 81).

En sık ölüm sebebi organ yetmezlikleri (kardiyak, serebral, karaciğer, böbrek, pulmoner), intrakranial kanama ve diğer iç organlardaki ciddi kanamalardır. Genelde ölüm hastalığın 4-14'üncü günlerinde görülür. Olguların hafif ya da ağır seyretmelerinin nedenleri kesin bilinmemekle birlikte genetik farklılıklar, viral yük, virüsün alınış yolu ve altta yatan hastalıklar gibi etkenler sebep olarak ileri sürülmüştür (31, 34).

2.8. Patogenez

Viral infeksiyonlara karşı savunmada IFN'lar önemli bir yere sahiptir. Yurtdışında 2008 yılında yapılan bir çalışmada farelere virüs verildikten sonra uygulanan IFN tedavisine cevap vermediği, farelere virüs enjekte edilmeden önce IFN uygulnması halinde ise IFN'un farelerdeki virüs replikasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ağır hastalarda enfeksiyonun seyri sırasında yeterli interferon artışı sağlanamazsa, konakta virüs replikasyonu engellenemeyebilir (85). KKKA'nın seyri sırasında etken virüs Tip I IFN'lar tarafından güçlü bir şekilde baskılansa bile virüs insanda yaptığı yıkıma hala devam etmektedir. Bu, ya virüsün uyardığı interferonların tedavi edici etkisinden ziyade koruyucu bir etkisinin olması ya da infekte hücreler tarafından IFN yapımının yetersiz olması ile açıklanabilir (86).

Üniversitemizde 2006 yılında yapılan bir çalışmada KKKA nedeniyle ölen hastaların hastaneye başvuru gününde serum virüs titrelerinin yaşayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu (5.5E+09 kopya/ml'ye karşı 5.7E+08 kopya/ml), ardışık ölçümlerde ise ölenlerde ölüm gününe kadar yüksek seyrettiği bildirilmektedir (87). Vireminin kontrol edilmesinde infeksiyonun başlangıcında doğal bağışıklık (innate immunity), daha sonra da özgül bağışıklık

(adoptive immunity) önemlidir (88). Aslında viral kanamalı ateş etkenleri arasındaki ortak patojenik özellik, etken virüslerin konakta antiviral cevabı başlatacak hücrelere saldırması ve bunların fonksiyonlarını bozmak suretiyle konağın bağışık yanıtını etkisiz hale getirmeleridir (73). Doğal bağışık yanıt IFN salınımını kontrol eden genlerin düzenlenmesi ve tip I IFN, IFN-α ve IFN-β, salınmasını arttırarak virüslere karşı konakta ilk savunmayı oluşturur. Virüs replikasyon süresince memeli hücrelerinden tip I IFN yanıtını geciktirmekte (infekte hücreler inokülasyondan 48 saat sonra IFN salgılamaya başlar), bu da konakta virüse karşı doğal bağışık yanıtı geciktirerek virüsün dokulara hızla yayılmasına neden olmaktadır (85).

KKKA'nın temel patogenezi özellikle moleküler düzeyde karmaşık olup, tam olarak aydınlatılamamıştır. Hasar virüsün replikasyonu ile birlikte immün ve vasküler sistemin zarar görmesiyle birlikte gerçekleşir (75). VKA'larda bağışıklık sistemi hastalığın iyileşmesinde önemli rol oynar. Özellikle ağır vakalarda bozulmuş olan bağışık yanıt sözkonusudur (76). Ebola virüslerinin oluşturduğu VKA'da hastalığın ikinci haftasında hala virüse özgül antikor yanıtı yoksa hastalık ölümle sonuçlanmaktadır (77, 78). Ayrıca KKKA nedeniyle ölen hastalarda antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmektedir (79, 80). Daha önce KKKA nedeniyle ölen hastalarda interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-12 (IL-12), ve tümör nekrozis faktör-α (TNF-α) gibi sitokinler araştırılmış ve yaşayan hastalara göre bu sitokinlerde anlamlı oranda yükseklik olduğu bildirilmiştir (30, 82).

VKA oluşturan virüsler birçok hücre tipini enfekte ederler. Ölümle sonuçlanmış vakalardan ve deneysel olarak enfekte edilmiş primatlardan alınmış olan dokuların immünhistokimyasal ve insitu hibridizasyon analizleri sonucunda, dendritik hücre, monosit ve makrofajlar, endoteller, hepatosit ve adrenal korteks hücrelerinde virüslerin replike olduğuna işaret etmektedir (76, 83). VKA'ya neden olan virüsler temelde mononükleer hücreleri aktive eder ve çeşitli kemokin ve sitokinlerin salınımı gerçekleşir. KKKA en önemli basamak olan endotel enfeksiyonu, direkt olarak endotel enfeksiyonu veya dolaylı olarak virüsün yönlendirdiği konak kökenli etmenlerin endotel aktivasyonuna ve disfonksiyonuna yol açması ile oluşur (73, 83). Kemokinler de endotelyumu dolaylı olarak hedef alır. Endotel hasarı trombositlerin agregasyonuna ve degranülasyonuna neden olur. Bu durum intrinsik koagülasyon kaskadının aktivasyonuyla hemostatik yetmezliğe katkıda bulunur. KKKA'da virüsün temel hedefini endotel hücreleri, monositler ve hepatositler oluşturur (40). Virüs, immünhistokimyasal ve ultrastrüktürel çalışmalarla KKKA vakalarının endotel hücrelerinde gösterilmiştir. Bu hücrelerde virüs ve virüs ile ilişkili tübüloretiküler cisimciklerin saptanması, kapiller damarlarda fonksiyon bozuklukları gelişmesine, bunun da hastalık sırasında ortaya çıkan klinik ve patolojik değşiliklere yol açtığını düşündürmektedir. Kapiller

permeabilitede artış ve pıhtılaşma fonksiyon bozukluklarıda kanamaya eğilim oluşturmaktadır (84).

KKKA hastalarında diğer sık karşılaşılan durum trombositopenidir. Hemen hemen bütün KKKA'da özellikle mortal seyreden vakalarda hastalığın erken dönemlerinde ileri derecede trombositopeni bulunmaktadır (6). Trombositopeni plateletlerin üretiminde azalma veya platelet yıkımı sonucunda gelişebilir. KKKA'da kemik iliği incelemelerinde hematopoetik öncül hücrelerin fagositozu (hemofagositoz) ve kemik iliği hipoplazisi gözlenmiştir (28, 76). Kartı ve ark.(28)'nın yapmış oldukları bir çalışmada KKKA tanısı ile takip edilen olguların %50'sinde hemofagositoz olduğu gözlenmiş ve bu durumun hastalardaki sitopeniyi açıklayabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca gelişen endotel hasarı da trombositopeninin bir nedeni olabilmektedir (84).

Plazma koagülasyon faktörlerinin düşüklüğü ise artmış tüketim ya da sentezin bozulması sonucunda gelişebilmektedir. Tüketimin artması yaygın damar içi pıhtılaşmasında (YDP) meydana gelir ve bu oluşum KKKA'ın erken ve belirgin özelliğidir (82). Kompleman sisteminin aktivasyonuyla birlikte immünkompleks oluşumu, kapiller yatağın hasarına, gelişen hasara bağlı olarak da renal ve pulmoner sistemde yetmezliğe neden olabilir (33, 84). İmmünkompleksler komplemanın C3a ve C5a fragmanlarını aktive ederek vasküler hasara neden olurlar. C5a, monositlerden IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF salgılanmsını aktive eder. IL-1, TNF ile endotel hücrelerinden fibrinolizin baskılanması için plazminojen aktivatör-inhibitör (PAI) ve ekstrensek pıhtılaşma yolağının başlaması için doku faktörü serbestleşir. Sonuç olarak vasküler hasar ve permeabilite artışı ile damar içi pıhtılaşma şiddeti artar. Plazma koagülasyon faktör sentezinin bozulması ise karaciğer disfonksiyonu sonucu gelişir. Karaciğer birçok koagülasyon faktörünün sentez yeridir. KKKA'da gelişen karaciğer disfonksiyonu özellikle hastalığın geç döneminde hemostazın bozulmasına katkıda bulunmaktadır (76). Hastalıkta meydana gelen karaciğer hasarının direkt viral sitopatik etkiye bağlı olduğu bildirilmektedir (40).

KKKA hastalığı nedeniyle ölen hastalarda şiddetli anemi, dehidratasyon, şok, serebral kanama, myokard enfarktüsü, akciğer ödemi ve plevral effüzyon görülebilir (6). Postmortem histopatolojik inceleme yapılan olgularda karaciğerde yaygın nekrotik fokus, yağlanma, kupffer hücre hiperplazisi, portal alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal alanlarda genişleme ve safra stazı gözlenmektedir. Dalakta fokal nekroz alanaları, akiğerde diffüz alveolar hasar, alveolar kanama alanları, hyalen membran oluşumu ve interstisyel alanların mononükleer hücrelerle infiltrasyonu, kalp dokusunda ise konjesyon ve interstisyel ödem gözlenmiştir (40). KKKA nedeniyle ölen ve böbrek yetmezliği gelişen başka bir hastada

da böbreklerin postmortem histopatolojik incelemesi yapılmış ve sadece glomerüllerde orta dereceli mezengial genişleme görüldüğü ve böbrek yetmezliğinin, sitokinlerin aracılık ettiği intrarenal hemodinamik disregülasyona bağlı olduğu bildirilmiştir (80).

2.9. Laboratuar Bulguları

Hastalığın özgül tanısında kullanılan yöntemler: virüs izolasyonu, serolojik tanı yöntemleri ve moleküler tanı yöntemleridir. Virüs izolasyonu ve kültür için mutlak surette biyogüvenilirlik seviyesi 4 olan laboratuvarlar gereklidir. Kanda oluşan immünoglobulin M (IgM) ve immünoglobulin G (IgG) yapısındaki antikorların her ikisini de göstermeye yönelik indirekt flüoresans antikor (IFA) ve enzyme-linked immunoassay (ELISA) testleri tanı amacıyla günümüzde kullanılmaktadır. Bu antikorların ikisi de hastalığın 7. gününden itibaren hasta serumlarında saptanabilir. Özgül Ig M yapısındaki antikorlar hastalıktan sonraki 4 ay kadar, Ig G yapısındaki antikorlar ise en az 5 yıl süreyle hasta serumunda saptanabilmektedir. Serolojik testler ile akut fazda Ig G yapısındaki antikor titresinin en az 4 kat artması ve Ig M yapısındaki antikorların tek ölçümde gösterilmesi ile tanı konulmaktadır. Ölüm ile sonuçlanan olgularda serolojik testler yüksek oranda negatif olabilir. Böyle olgularda tanı için kan ve karaciğer dokusunda virüsün gösterilmesi gereklidir. Reversetranscriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tekniği ile hastalığın 16. gününe kadar serum örneklerinde viral RNA saptanabilmektedir.

Laboratuarda görülen anormallikler anemi, lökopeni veya lökositoz, trombositopeni, ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), kreatin fosfokinaz (CPK), laktat dehihrogenaz (LDH) ve gama glutamiltransferaz (GGT) düzeylerinde artış, uzamış kanama zamanı, PT (protrombin zamanı) , INR (international normalized ratio) ve aPTT (aktive parsiyel tromboplastin zamanı) düzeylerinde artış, FDP (fibrin yıkım ürünleri)'de artış ve fibrinojende azalmayı içerebilir. İdrar tahlilinde proteinüri ve hematüri ortaya çıkabilir, oligüri ve azotemi gelişebilir (35, 36). Ağır olgularda bilirubin, üre ve kreatin değerlerinde artış saptanabilir (81). Terminal dönemde erişkin tipi solunum yetmezliği sendromu (ARDS) ve koma durumunda kan gazlarında bozukluklar ve yaygın damariçi pıhtılaşması (YDP) göstergesi parametrelerindeki bozukluklar tabloya eklenebilir. Klinik olarak iyileşen hastalarda bozulan değerler bir iki hafta içinde normale döner (37).

KKKA mortalite kriterleri ilk kez 1989 yılında Swanepoel ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (33).

1- Kan lökosit sayısı ≥10 bin hücre/ml
2- Kan trombosit sayısı < 20 bin hücre/ml
3- AST değeri ≥200 İU/L

4- ALT değeri ≥150 İU/L

5- Aptt ≥60 sn veya fibrinojen seviyesi < 110µg/dl

Buna göre, klinik semptomların başlamasından sonraki ilk beş günde yukarıda belirtilen kriterlerden en az birisi varsa şiddetli vaka olarak tamınlanmıştır. Bu bulguların en az birinin varlığında ise hastaların mortalite oranı %90 olarak belirtilmiştir (33). Ergönül ve ark. (113)'nın yapmış olduğu bir çalışmada şiddetli vakalarda AST ve ALT (sırasıyla >700 ve >900 İU/L) seviyelerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.10. Tanı

Hastalığın morbidite ve mortalitesinin yüksek olması sebebi ile hızlı bir şekilde tanı konması gerekmektedir. Ayrıca erken tanı konulması hastalara erken müdahale ve nozokomiyal enfeksiyonların gelişmesinin önlenmesi açısından çok önemlidir. Hastanın klinik semptomlarıyla birlikte öyküsünde endemik bölgeden gelmesi, kene ısırığı veya kene temasının olması, hasta insanların veya hayvanların kan veya dokularıyla temas etmesi önemlidir. Endemik bölgeye seyahatin olması KKKA tanısı açısından önemlidir. Oldukça bulaşıcı bir virüs olduğu için test işlemleri biyogüvenlik düzeyi (BSL) 4 olan laboratuarlarda yapılmalıdır (6). Viremi hastalığın başladığı günden itibaren on ikinci güne kadar sürebilir. Bu dönem içerisinde kan ya da doku örneklerinden virüs izole edilebilir ve hücre kültürlerinde (CER, vero E6 hücre kültürleri) veya süt emen yavru farelere beyin inokulasyonu ile üretilebilir (38). Viral antijenlerin kan ve doku örneklerinden tespiti için enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), indirekt flüoresans antikor (IFA) ve çesitli immünhistokimyasal yöntemler kulanılabilir (39, 40). Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile virus geni tespit edilebilir ve özellikle uygun şekilde saklanan örnekler bu yöntemle test edildiğinde oldukça başarılı sonuçlar alınabilir (2,41,42). Otomotize RT-PCR yöntemlerinin geliştirilmesi ile RT-PCR'ın aksine kontaminasyon riskinde azalmaya, hem duyarlılığın hem de özgüllüğün artması ve sonuçların daha hızlı elde edilmesine neden olmuştur (6, 11).

Hastalığın ilk haftası içerisinde virüs izolasyonu, antijen testleri ya da RT-PCR tanıda en uygun testlerdir. Hastalığın altıncı gününden itibaren virüse karşı gelişmiş antikorlar serumda ELISA veya IFA yöntemi ile tespit edilebilir (43,45). Hastalığın ortalama 7-9. günlerinden itibaren Ig M ve Ig G sınıfı antikorlar ortaya çıkar, ilerleyen gün ve haftalarda ise titreleri artar. Mortalite erken gelişebildiğinden, özellikle ciddi vakalarda henüz yeterli antikor titresi gelişemeden vakalar kaybedilebilir. Bu sebeple antikor düzeyleri hastalığın ilk haftasında tanıya yardımcı olmaz. Serum Ig M düzeyleri dört aya kadar tespit edilebilir, IgG

titreleri ise beş yıl kadar pozitif kalabilir ve zaman içerisinde tespit edilemeyecek düzeylere gerileyebilir (46).

2.11. Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda riketsiyoz, erlihiyoz, leptospiroz, salmonelloz, borreliyoz ve bruselloza ilaveten meningokokal enfeksiyonlar, Q ateşi, Sıtma, Sarı humma, Dang ateşi, Omsk kanamalı ateşi, sepsis, sistemik inflamatuar cevap sendromu (SIRS), idiyopatik trombositopenik purpura (ITP), febril nötropeni, vitamin B12 eksikliği, metamizol eksikliği ve diğer VKA'lar da akla gelmelidir (6, 93).

2.12. Tedavi: KKKA hastalığında tedavide 3 ana yaklaşım söz konusudur.

2.12.1. Destek Tedavisi

KKKA hastalığında tedavinin temelini destek tedavisi oluşturur. Uygulanan destek tedavisinin ayarlanmasında hastanın hem vital bulgularının hem de laboratuar değerlerinin izlemi önem taşır. Hastalara gerektiğinde trombosit süspansiyonu, taze donmuş plazma ve eritrosit süspansiyonu gibi kan ürünleri ile destek tedavisi verilmelidir (11,47). Ağır ve çoklu organ yetmezliği gelişen hastalarda sıvı-elektrolit replasmanı, diyaliz uygulanması, hatta yoğun bakım ve solunum desteği gerekebilir (48). Takip edilen hastalarda günlük tam kan sayımı yapılmalı ve hematolojik parametreleri yakından izlenmelidir. Olası kanama odaklarının kontrolü yapılmalı, zorunlu durumlar dışında kanamaya neden olabilecek kas içi enjeksiyonlardan ve koagülasyon sistemini etkileyecek ilaç kullanımından kaçınılmalıdır (11).

2.12.2. Antiviral tedavi

Hastalığın henüz özgül bir antiviral tedavisi yoktur. Hafif olgular kendiliğinden iyileşebilmektedir. KKKA'da etkinliği tartışılan ve günümüzde hastalığın özgül tedavisinde kullanılmakta olan tek ilaç ribavirin'dir. Geçmiş yıllarda oral ribavirinin KKKA tedavisinde yararlı olduğuna dair olgu sunumları ve retrospektif historik kontrollü çalışmalar bulunmaktadır (7, 10). Ribavirinin in vitro çalışmalarda hücre kültürlerinde virüs replikasyonunu durduğu saptanmıştır (47). Tignor ve ark. (5)'nın yaptığı çalışmada ribavirinin enfekte farelerde virüs replikasyonunu azalttığı, organ patolojisini önleyebildiği ancak viremiyi önleyemediği saptanmıştır.

Ribavirin (1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karboxamid) geniş spektrumlu gunaozin analoğu antiviral etkili bir ajandır. Ribavirin hücre içi guanozin trifosfat seviyesinde azalma yapar, sitokinlerin ve interferonların stimülasyonuyla antiviral gen ekspresyonu ve konakta T-hücre cevabını artırır, makrofaj indüksiyonunu inhibe eder, viral polimerazın enzimler aracılığıyla eklenme işlemini ve viral polimerazın doğrudan inhibisyonuna yol açar. Sitotoksik etkiye ilaveten geniş bir antiviral spektruma sahiptir (97,98). Yapı yönünden

guanozine benzemesi nedeniyle, guanozin prekürsörlerinin sentezini bozarak virüslerda kalıp çıkmasını engellemektedir (49, 50). Vücutta önce fosfatlanan ribavirin, adenozin kinaz aracılığı ile ribavirin 5'monofosfata dönüştürülür. Ribavirin 5'monofosfat, tekrar fosfatlanır ve ribavirin 5'trifosfat meydana gelir. Oluşan bileşik, hem guanozin trifosfat hem de adenozin trifosfat ile yarışmalı bir şekilde viral RNA polimerazın etkinliğini ve bunun sonucunda da yeni kalıbın çıkmasını engeller (49, 51). Ribavirinin viral protein sentezini durdurması olayının, ribavirin 5'trifosfatın, viral mRNA'nın konak hücre ribozomuna bağlanmasını engelleyerek gerçekleştirdiği ifade edilmektedir (49, 52).

Ribavirin birçok RNA ve DNA virüslerinin replikasyonlarını inhibe eder. Orthomyxovirus, paramyxovirus, arenavirus, bunyavirus, flavivirus, herpesvirus, adenovirus, poxvirus, human immundeficiency virus (HIV) *ve* retroviruslara invitro olarak etkili bulunmuştur (97,98). Ancak pratikte birkaç viral enfeksiyonun [hepatit C virusu (HCV), respiratuar sinsityal virus (RSV), Influenza A ve B virus, CCHFV ve diğer bazı VKA virusları (Lassa atesi virusu, Hantavirus), SARS virus] tedavisinde kullanılır. VKA tedavisinde kullanılan tek antiviral ajandır. İnhalasyon, oral veya intravenöz olarak kullanılabilir. Oral biyoyararlanımı %33-69 oranındadır, gıda ile plazma düzeyleri artar, bu nedenle tok karna alınması uygun olur. Plazma yarılanma ömrü 30-40 saat kadardır. İki metabolik yolla değişikliğe uğrayan ribavirinin vücuttan eliminasyonu da böbrekler tarafından olmaktadır. Bu nedenle böbrek problemi bulunanlarda gerekli doz ayarlaması yapılmalıdır (53). KKKA'da ribavirin 30 mg/kg yükleme dozundan sonra her altı saatte bir 15 mg/kg dört gün süreyle ve sonrasında sekiz saatte bir 7,5 mg/kg altı gün daha olmak üzere, toplamda 10 gün süreyle önerilmektedir (53, 54).

KKKA'lı hastaların kan, serum ve atıklarıyla maruziyet durumlarında 500 mg dozunda 6 saat arayla 7 gün süreyle ribavirinin profilaksi amacıyla verilebileceğini belirten yayınlar varsa da bu durumlarda profilaktik amaçlı ribavirin kullanımı DSÖ tarafından önerilmemektedir (93, 100).

Sistemik ribavirin uygulamasına bağlı anemi, retikülositoz ve hiperbilirubinemi görülebilir. Ribavirin kullanımı ile ilişkili ana toksisite hemolitik anemidir. Bu yan etki, ribavirin trifosfatın eritrosit içinde birikerek eritrosit fonksiyonlarını engellemesine bağlanmıştır (52,55). Ribavirin kullanımının komplikasyonlarından biri olan hemolitik anemi, bazen tedavinin kesilmesine yol açabilir (56). Ribavirine bağlı anemi genellikle geri dönüşümlü ve doza bağlıdır. Hızlı infüzyonu titremeye yol açabilir. Ayrıca ribavirine ait ağız kuruluğu, terlemede artış, kasıntı, döküntü, asteni, baş ağrısı ve baş dönmesi, nefes darlığı, diyara, kusma, kas ağrısı, depresyon, farenjit, bulanık görme ve nötropeni olmak üzere pek

çok yan etkileri bildirilmiştir (55). Gebelerde kullanımı kontrendike olmasına rağmen annenin yaşamının söz konusu olduğu ciddi durumlarda önerilmektedir (33, 99).

2.12.3. Diğer Tedavi Seçenekleri

KKKA'da nötralizan antikor zayıftır. Özellikle ölen hastalarda IgG cevabı sağ kalanlara göre düşüktür (101). Ayrıca ölen hastalardaki viral yükün hastaneye kabulde sağ kalanlara göre daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (102). Yine sağ kalan hastalarda antikor oluşumu ve bu antikorlarla virüs replikasyonunun baskılanması ile vakalar hastalığı daha kolay atlatabilmektedir. Bu bilgilere dayanarak hastalara erken dönemde hiperimmün serum verilmesi, virüs klirensinin sağlanmasında faydalı olabileceğini düşündürtmüş ve bununla ilgili olarak ülkemizde immün serumun etkinliğini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Hastalığı geçirenlerden elde edilen konvelesan plazma, pasif immünoterapi olarak toplamda yedi hastaya uygulandığı ve bu hastaların iyileştiği bildirilmiştir (103,104). Aydın ve ark.(105) tarafından yapılan başka bir çalışmada 22 KKKA vakasına immün serum uygulanmış ve çalışma sonucunda vakalarda mortalitede istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte, hastaların trombosit ve diğer laboratuar değerlerinde daha erken düzelme olduğu bildirilmiştir. İyileşmiş hastalardan elde edilen immün plazma uygulanması geçmişte yararlı bulunmasına rağmen yeterli klinik veri yoktur (6,11).

2.13. Korunma ve Kontrol

Bütün enefeksiyon hastalıklarının kontrolünde korunma ve izolasyon önlemleri büyük öneme sahiptir. Ancak, doğrudan veya dolaylı olarak çok hızlı bir şekilde bulaşabilen ve bugün tam olarak etkili bir tedavisi bulunmayan viral hastalıklarda korunma ve izolasyon önlemleri oldukça önemlidir. Tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi KKKA'da korunma ve kontrol önlemlerinin alınması çok önemli ve gereklidir (100). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerilerine göre hastanın kan ve vücut sıvıları ile temastan kaçınılmalıdır. Bu şekilde bir temasın söz konusu olması halinde temas edenin en az on dört gün kadar ateş ve diğer belirtiler yönünden takip edilmesi gerekmektedir. Mümkün olduğu kadar kenelerin bulunduğu alanlardan (hayvan barınakları, piknik amaçlı gidilen su kenarı, otlak seklindeki yerler, çalı çırpı ve gür ot bulunan yerler, av alanları, orman vb.) kaçınılması gerekmektedir. Hayvancılıkla uğraşanlar hayvanlarını kenelere karşı uygun akarisitlerle düzenli olarak ilaçlamalı ve hayvan barınakları kenelerin yasayamayacağı şekilde yapılmalıdır. Kene saldırılarından korunmak için repellent olarak bilinen böcek kaçıranlar cilde sürülerek veya elbiselere emdirilerek kullanılabilmektedir. Açık alanlarda yapılabilecek kene mücadelesi amacıyla; carbaryl ve propoxur, deltamethrin ve lambda-cyhalothrin, permethrin, pirimiphos-methyl kullanılabilmektedir (6, 16, 57, 70).

3. KKKA ve İnterferonlar

3.1. Doğuştan Gelen Bağışıklık Yanıtları

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve kazanılmış immün sistem olmak üzere insan bağışıklık sisteminin iki bileşeni vardır. Konağın bir patojen mikrorganizma tarafından işgalinden sonraki dakikalar içerisinde doğuştan gelen bağışıklık sistemi aktif hale gelir ve enfeksiyonun ilk saatleri ve günlerinde konak savunmasını koordine eder (106). İnsanlar günlük hayatlarında potansiyel patojenlerle karşılaşırlar, ancak genellikle doğuştan gelen ya da spesifik olmayan immün yanıtlar enfeksiyonu kontrol etmek için yeterli olmakta ve insanların hasta olmalarını engellemektedir. Bu spesifik olmayan bağışıklık sistemleri, anatomik bariyerler (örneğin deri, gastrointestinal sistem, düşük pH, ateş durumlarında yükselen vücut sıcaklığı), salgılanan moleküller (Örneğin interferonlar, sitokinler ve nitrik oksit) ve hücresel faktörlerdir (örneğin, NK hücreleri dendritik hücreler ve makrofajlar). Doğuştan gelen savunmanın bozulduğu durumlarda konağı korumak amacıyla antijene spesifik olan kazanılmış adaptif immün yanıtlar meydana gelir (90).

Virüsler, oldukça küçük olan ve hücre içine yerleşim gösteren mikroorganizmalardır. Bunlar hücre içinde çoğaldıktan sonra vücuda yayılırlar ve faklı dokulara yerleşirler. İmmün sistem, virüsleri değişik fazlarda engelleyerek yaşam siklüslerini bloke eder. Virüsler insanlar için çok kuvvetli antijenik özellikler taşırlar. Virüsler organizmaya girdikten sonra hümoral ve hücresel olmak üzere iki türde immün yanıtı uyarırlar. Hümöral immün yanıt virüslerin infektivitesini bloke ve nötralize eder. Virüslere karşı oluşan IgM ve IgG türü antikorlar viremi sonucu gelişen viral infeksiyonları kontrol etmeyi amaçlarken, IgA sınıfındaki antikorlar da mukozadaki viral infeksiyonları sınırlayarak yayılmalarını durdurmaktadır. Buna karşın, virüslerle infekte hücreleri ortadan kaldırmayı amaçlayan ve hücresel immün cevapta rol alan sitotoksik hücreler ise virüslerin zarf proteinlerine veya kor proteinlerine yönelik aktivite gösterirler. Viral infeksiyonlarda gelişen immün reaksiyonlar, virüslerin yapılarına ve bireyin genetik yapısal biyolojik özelliklerine bağlıdır (58).

Virüslere karşı en etkin ve hızlı konak cevabı tip I interferonların üretimi (IFN- α/β) ile oluşmaktadır ki bu da doğuştan gelen antiviral bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Bildiğimiz kadarıyla, memelilerin vücudunda ki tüm çekirdekli hücreler tip I IFN sentez ve sekrete edebilmektedir. Ancak, indüksiyon modu ve salgılanan IFN tipi hücre tipleri arasında farklılık gösterebilmektedir. Tip I Interferonlar amino asit dizilerine göre sınıflandırılırlar, bu amino asit dizilerine göre çok sayıda IFN-α alt tipi (en azından 13) ve tek bir IFN-β alt tipi

bulunmaktadır. Ekspresyon şekilleri ve interferonların hangi zaman diliminde sentezlendiği, daha çok belirli hücre türüne göre değişmektedir. Salgılanan interferonlar komşu hücreleri uyararak güçlü antiviral proteinlerin oluşmasını sağlar. İnterferonlar antiviral rollerinin yanı sıra, apoptozisin düzenlenmesinde ve daha da önemlisi immünomodülasyon ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu da dahil olmak üzere başka biyolojik faaliyetlerde de rol almaktadırlar (92).

3.2. İnterferonlar

IFN ilk olarak 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından keşfedilmiş, influenza virüsü ile enfekte civciv hücrelerinden salgılanan ve bir virüse dirençli durumdaki diğer hücrelere transfer olabilen bir faktör olarak tanımlanmıştır (90). İnterferonlar, hücresel düzeyde etkili olan ve antiviral, immünmodülatör ve antiproliferatif olarak etki eden çok sayıda ISG salgılanmasın aktive ederek etkili olan proteinlerdir (86,90). Lenfositler, lenfosit olmayan lökositler ve fibroblast hücreleri virüsle infekte olduklarında interferon sentezleyebilmektedirler. Alfa (α) interferon, Beta (β) interteron, Gamma (γ) interferon olmak üzere üç alt tipi vardır. Alfa ve beta interferon daha önceleri Tip I, gamma interferon ise tip II interferon olarak bilinmekteydi. Interferonların, genel olarak hücrelerdeki etkilerini üç grupta özetlemek mümkündür. Bunlar antiviral, hücre proliferasyonu ve immun cevabın düzenlenmesindeki etkileri içermektedir. Özellikle de tip I IFN (başlıca α ve β) bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve spesifik antiviral etkinlikte kritik bir işleve sahiptir ve enfeksiyonun erken aşamasında virüsün yayılmasının sınırlandırılmasında önemli bir rol oynar (90).

IFN'lar indüklenebilir sitokinlerdendir ve spesifik reseptörler tarafından tanınması ve tanımlanması sırasına göre tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç alt grupta gruplandırılırlar. Tip I'in 13 alt tipi bulunmaktadır. Bunlar IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-ε ve IFN-τ vb. içermektedir. Tip II IFN-γ'yı içerir. Son zamanlarda tip III IFN-λ keşfedilmiştir. IFN-λ, IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2 (IL-28A) ve IFN-λ3 (IL-28B) olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır (90).

IFN üretimi bir virüs enfeksiyonunu takiben hızla meydana gelir. IFN-α ve β, tüm çekirdekli hücreler tarafından üretilirler, ancak bunların ana üretici hücreleri plazmositoid dendritik (pDCs) hücrelerdir. Tip I İnterferonlar (IFN) virüs enfeksiyonuna karşı oluşan ilk savunma hattıdır ve omurgalıların doğuştan gelen bağışıklık yanıtı için vazgeçilmezdir. Yapılan çok sayıdaki çalışma insanlardaki IFN'ların çeşitli virüslere karşı antiviral etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar insanlarda MXA proteininin interferona bağlı antiviral etkilere büyük bir katkı sağladığını ortaya koymuştur. Ancak, IFN tedavisi

sonrasında virüs replikasyonunda gözlenen düşüşün tek belirleyicisinin MXA olmadığı da aynı çalışmalarda tespit edilen bir diğer noktadır. Bu bulgulara göre antiviral etkilere, dsRNA bağımlı protein kinaz (PKR) ve büyük olasılıkla diğer bazı proteinlerde katkıda bulunmaktadır. IFN sisteminin önemi; IFN yanıtının, IFN'a antagonistik özellikleri olan tüm bileşenleri hedef alan çok sayıda viral olarak kodlanmış gen ürünleri ile gösterilmiştir. Genellikle bu antagonistler immün yanıtın birkaç farklı yolakları üzerinde çok fonksiyonlu proteinlere etkilidir. Aynı çalışmada diğer birçok virüslerin enfeksiyonlarında olduğu gibi Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) virüsü varlığında da virüsün konağın immün yanıt mekanizmalarına müdahale ettiği gösterilmiştir. Bunun sonucunda KKKA virüsünün, erken immün yanıtların oluşmasını büyük olasılıkla, IRF-3 yoluna müdahale ederek geciktirdiği düşünülmektedir. Bu ise enfeksiyonu takiben oluşan IFN'ların sekresyonunun görece geç oluşmasını açıklamaktadır (90).

Bu araştırmada viral RNA'ların 5'ucundaki trifosfatların RIG-I'in tanınmasında önemli belirleyiciler olduğu gösterilmiştir. Bazı KKKA virüsleri onların 5'ucunda trifosfatlardan monofosfatlar oluşturarak RIG-I'in tanınmasını önlediği de gösterilmiştir. Bu bulgular KKKA virüsünün, konağın antiviral sinyalizasyonunu engelleyebilmesinin yanında doğal immün yanıtın aktivasyonundan kaçınmak için yeni bir strateji belirlediğini de göstermektedir. Eğer bir KKKA virüsünün enfeksiyonunu takiben immün yanıtların oluşmasında gözlenen bir gecikme varsa bu durum RIG-I'den kaçınma ve/veya bir interferon antagonisti salgılanması kombinasyonu sonucu olabilir şeklinde yorumlanabilir. Buna bağlı olarak KKKA virüsü, IFN'lara ve IFN-kaynaklı antiviral proteinlerin etkilerine duyarlıdır diyebiliriz. Ancak, bu virüslerin enfeksiyonu erken algılamayı önlediği ve interferonun indüksiyonunu ortadan kaldırdığı da aynı çalışmada tespit edilmiştir (90).

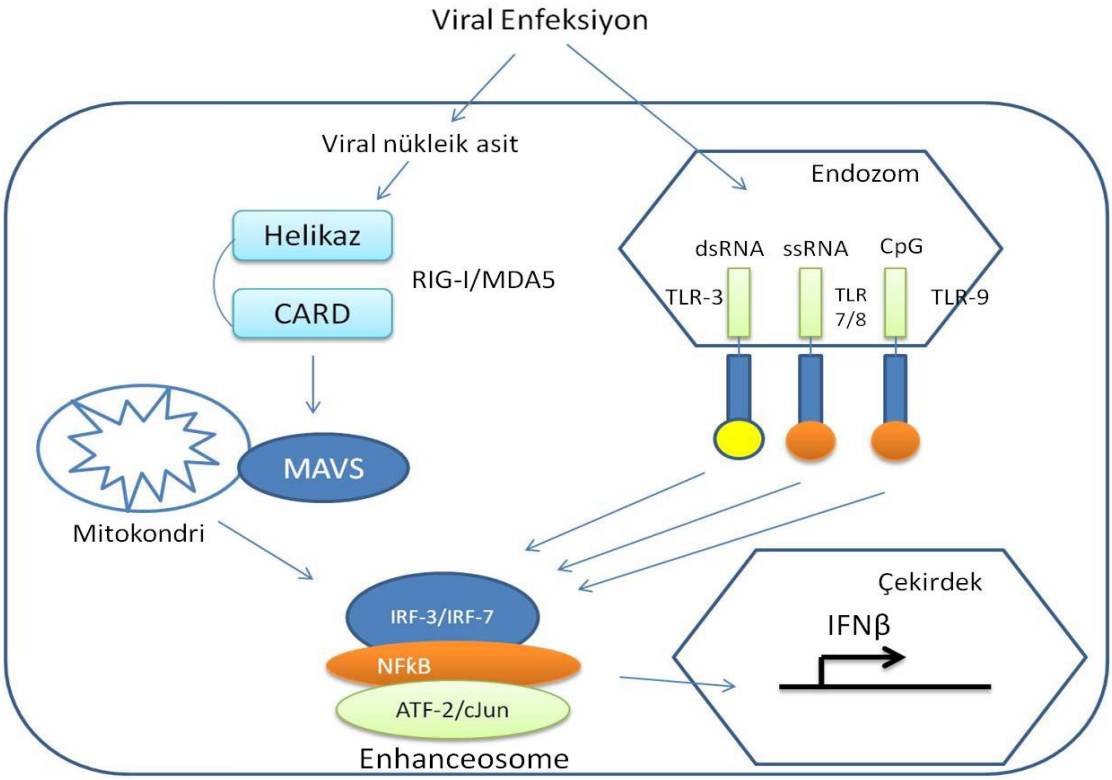
Virüslerle ilk temas ile birlikte IFN üretimi aktive edilir ve virüsün çoğalması yavaşlar hatta durur ve böylece organizma adaptif bağışıklık yanıtı oluşturmak için zaman kazanmış olur. İnterferonlar, özgül olmayan hümoral immün yanıtlardandır. Viral infeksiyon sürecinde hücre içine giren virüsler interferonların sentezlenmesine ve salınmasına neden olurlar. Tip I interferonlar viral infeksiyon sonrasında özgül olmayan bir biçimde değişik hücrelerden sentezlenir. Bunlar antijenik uyarılar sonucu CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinden sentezlenen gama interferondan farklıdırlar. Tip I interferonlar hücrelerde "anti-viral durum" oluştururlar. Anti-viral durumda hücrenin proliferasyonu ve replikasyonu inhibe olur ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından virüsle infekte olan hücrelerin lizis ile yok edilmeleri kolaylaşır (58). Interferon (IFN) sistemi her türlü virüse karşı doğuştan gelen savunmada rol alan başlıca faktörlerden biridir. Enfekte hücreler bu tehlikeli ve davetsiz misafirlerin daha fazla

çoğalmasını ve yayılmasını önlemek için, enfekte olmamış hücrelerde antiviral etkiyi başlatmak başlatmak amacıyla, vücutta dolaşan interferonları sentezler ve dolaşıma salgılarlar (90). Epitel hücreleri, fibroblastlar ve nöronlar enfeksiyon durumunda ilk tepki olarak ve esas olarak IFN-β salgılar. Bu aşamada öncelikle virüsün konak hücrelerine yerleşmesi ve replikasyonu engellenmeye ya da en azından azaltılmaya çalışılır. Ancak enfeksiyonun sonraki aşamalarında IFN-β salınımı durur ve yerini interferon-α salınımına bırakır. Burada belirtilmesi gereken nokta, dendritik hücrelerin immünsürveyansta önemli bir rol oynadığı ve bu hücrelerin doğal ve kazanılmış immünite arasında bir arabirim rolü oynadığıdır. Bu hücreler doğrudan IFN-α alt türlerini yüksek düzeylerde üreten hücrelerdir (92).

Fibroblastlardaki IFN indüksiyonu esas olarak intrasellüler yolla meydana gelir. Çift-zincirli (ds) RNA ve 5'trifosforile tek iplikli (ss) RNA içeren RNA virüsleri IFN-β genini aktive eden bir sinyal zincirini aktive ederler. Viral RNA'nın esas hücre içi reseptörleri RIG-I ve MDA-5 gibi iki RNA helikazıdır. RIG-I ve MDA-5, virüslerin farklı ve birbiriyle örtüşmeyen kümelerini tanımaktadır bu da RNA'nın tanınmasının belli ölçüde spesifik olduğunu düşündürmektedir. Nitekim son zamanlarda RIG-I'in viral ssRNA'nın kapağını açıp 5'ucuna trifosfat gruplarını bağlamakta eşsiz bir yeteneğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, görünüşe göre MDA-5 aktivasyonu daha çok uzun dsRNA yapılarına bağlımlı iken RIG-I daha çok kısa dsRNA moleküllerine bağlanmaktadır. RIG-I ve MDA-5 bir viral RNA'ya bağlanma sonucunda transkripsiyon faktörü IRF-3 fosforilasyonu ile sonuçlanan bir sinyal zincirini indüklemektedir. IRF-3, IFN düzenleyici faktör (IRF) ailesinin bir üyesidir ve IFN-β promotörünün aktivasyonunun başlatılmasında merkezi bir rol oynar. Fosforile IRF-3 homodimerize olur ve çekirdek içine hareket eder, daha sonra burada INF-β'nın mRNA sentezini başlatır. Bu ilk dalga IFN ekspresyonu yalnızca fibroblastlarda düşük miktarlarda mevcut olan ilişkili bir faktörü yani IRF-7'yi tetiklemektedir. IRF-7'nin ekspresyonu ve aktivasyonu pozitif bir feed-back döngüsünü besleyerek IFN-α alt tiplerinin yani ikinci dalga çeşitli interferonların sentezini başlatır. Bununla birlikte IFN gen ekspresyonunu arttıran transkripsiyon faktörleri NF-κB (aktive RIG-I, MDA-5 ve dsRNA bağımlı protein kinaz, PKR) ve AP-1 (aktive strese bağımlı Jun kinaz) harekete geçirilerek uyarılır (90) (Şekil 3.1).

Miyeloid dendritik hücreler (mDCs) içerisindeki en belirgin olan plazmositoid dendritik (pDC'lerde) hücreler lenfatik sistemin esas IFN üreten hücreleridir. mDCs klasik hücre içi yolu ile dsRNA'yı algılarlar, buna ek olarakta, pDC'lerde ağırlıklı olarak endozomal toll-like reseptör (TLR)3, TLR7 ve TLR8 ile ssRNA'yı tanırlar ve RNA virüs enfeksiyonlarını kontrol ederler (92). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, spesifik olmayan bir

koruma sağlar ve belirli sinyal mekanizmaları aracılığıyla çeşitli patojenlere karşı adaptif immün mekanizmaları harekete geçirir (106, 107, 108).



Şekil 3.1.Viral enfeksiyonun tanınması için iki ana yolun şematik özeti, RIG-I/MDA5 ve TLR yolları ve FN-β promoterin indüksiyonu.

Toll-like reseptörleri (TLR) memelilerde bulunan ve mikrobiyal bileşenlerin belirli kalıplarını tanıyan özel yüzey moleküllerdir, bunlar patojenler arasında yapısal olarak muhafaza edilmektedir. Ancak, bunlar memelilerde bulunmazlar ve bunlar doğuştan gelen bağışıklık sistemini devreye sokan sinyal kaskadlarını başlatabilirler (106, 109). Onlar germ hattında kodlanırlar. Bu reseptörleri öncelikle, lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC) gibi doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından sekrete edilirler (106, 109). TLR'nin uyarılması doğuştan gelen bağışıklığın ve gen ekspresyonunun farklı kalıplarının aktive eder, inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin ana üretiminin aktivasyonuna neden olur (106). Günümüzde memelilerde 10 çeşit TLR tanımlanmıştır. Viral enfeksiyonların patogenezinde TLR'nin rolü için giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, TLR7 ve TLR8 stimülasyonunda, bir anti-HIV etkisi kanıtlanmıştır (106, 110). TLR üzerinden iki büyük sinyal yolağı aktive edilir, bunlar, nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve interferon düzenleyici faktör (IRF) yollarıdır (106, 111). Bunun sonucunda aktive olan TLR'ler farklı hücre içi

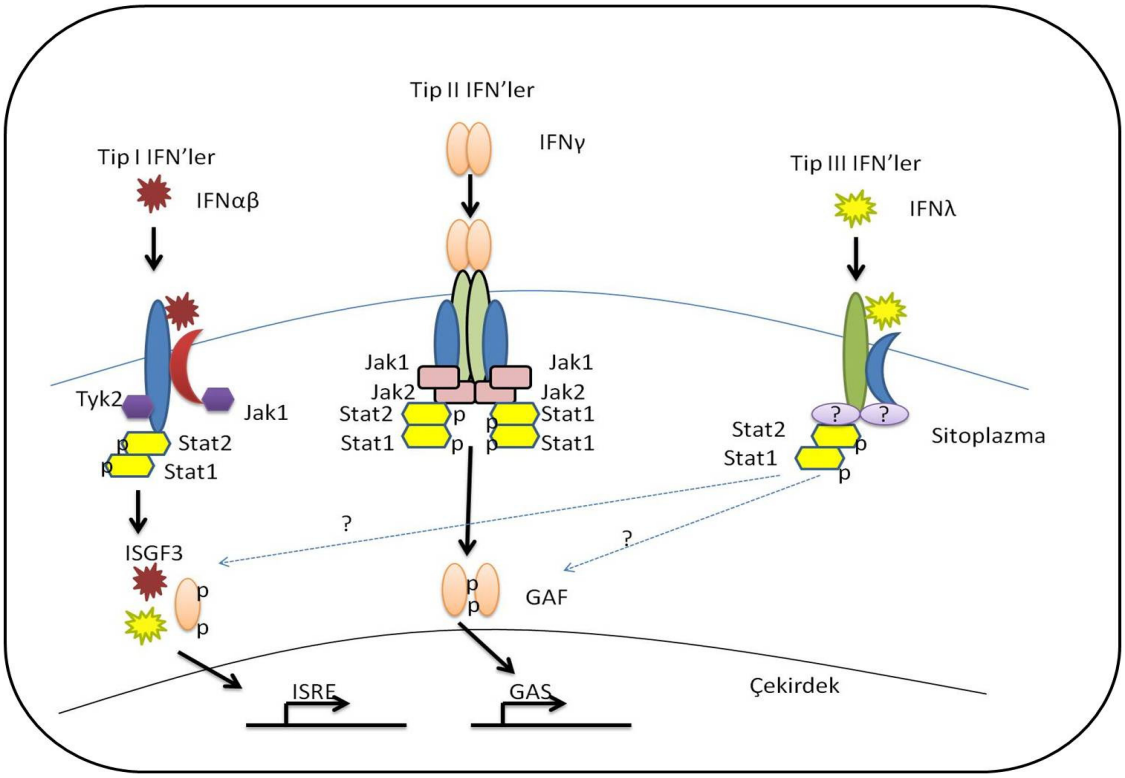
adaptör molekülleri üzerinden sinyal oluşturarak IRF-3 ve NF-κB bağımlı IFN transkripsiyonunu indüklerler (92). NF-κB yolu, enflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretiminde önemli bir rol oynarken, IRF yolu tip I IFN üretimine neden olur (109). Şu anda, memelilerde bilinen dört adet TLR nükleik asit algılanmasından sorumlu tutulmuştur: TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 (106, 111). Tüm nükleik asit algılayan TLR'ler için ortak görev tip I IFN'ların indüksiyonudur. Tip I IFN'un antiviral immün yanıtta etkileri çok yönlüdür ve büyük önem taşımaktadır (111).

KKKA enfeksiyonu ağır seyreden bazı vakalarda ölümcül olabilir. KKKA enfeksiyonunun klinik seyri ve sonuçları da bazı insanlarda farklı olabilir. Bazı hastalarda tablonun ağır hastalığa ilerlemesinin ve diğer bazı hastalarda ise sadece hafif bir enfeksiyon şeklinde syretmesinin nedeni tam olarak belli değildir. Bu durumun konakçının genomu içindeki TLR'lerdeki mutasyonlara bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu TLR'indeki mutasyonların KKKA hastalığının şiddetindeki ağır semptomatik enfeksiyon geliştirme riskine katkıda bulunduğu muhtemeldir (106).

Tüm IFN-α/β alt tipleri neredeyse tüm ana hücreler üzerinde yaygın olarak bulunan tipI IFN reseptörüne bağlanır ve aktive eder. IFN-α/β bağlanması intraselüler kısımlardaki reseptörde yapısal değişikliklere yol açar ve JAK-STAT sinyal yolağını etkinleştirir. Bu transkripsiyon sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT) proteinleri, latent haldeki sitoplazmik transkripsiyon faktörleri Janus kinaz (JAK) aile üyeleri olan JAK-1 ve TYK-2 tarafından fosforile edilir. Fosforile olan STAT -1 ve STAT -2 üçüncü ve yeni bir faktör olan IRF-9 (aynı zamanda P48 olarakta adlandırılır) ile birikte, IFN gen faktör 3 (ISGF-3) olarak bilinen uyarılmış bir kompleks oluşturur. Heterotrimer ISGF-3 çekirdeğe transloke olur ve IFN ile uyarılmış genlerin (ISG) promotör bölgelerindeki IFN ile uyarılmış yanıt elemanlarına bağlanır (ISRE), böylece onların transkripsiyonunu indükler (90) (Şekil 3).

IFN-α/β'lar 300'den fazla IFN stimüle eden genlerin ekspresyonunu (ISGs) aktive ederek antiviral antiproliferatif ve immünomodülatör fonksiyon görürler. IFN-kaynaklı proteinler, enzimler, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzey glikoproteinleri, sitokinler, kemokinler ve fonksiyonu bilinmeyen çok sayıda faktörleri kapsar (86, 89, 90). Şimdiye kadar, antiviral aktivitesi olan sadece bir kaç protein ayrıntılı olarak karakterize edilebilmiştir. Bunlar içinde, Mx GTPaz, Protein kinaz R (PKR), 2'5' oligoadenilat sentetaz (2-5 OAS) / RNaseL sistemi, RNA spesifik adenosin deaminaz 1 (ADAR 1), viperin ve ISG56 (p56) ve ISG20 gen ürünleri vardır. Mx proteinleri dynamin benzeri büyük bir GTPaz süperailesine

aittir ve farelerdeki orthomyxovirüslere karşı gelişen genetik direncin mediyatörleri olarak tespit edilmişlerdir (89, 90).



Şekil 3.2.Tip I, II ve III IFN'ların Jak-Stat sinyalizasyon yolakları

İnsan MxA proteini enfekte virüsün hücreye girmesinden kısa bir süre sonra viral ribonükleoprotein parçacıklarını hedefleyerek virüsün replikasyonunu bloke eder. PKR, 2-5 OAS ve ADAR yapısal olarak latenttir ve inaktif şekilde exprese edilirler. Bunlar konağın antiviral savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan proteinlerdir. Bunların bazal mRNA seviyeleri IFNα/β tarafından düzenlenir ve bu enzimlerin viral dsRNA tarafından aktive edilmektedir. PKR aynı zamanda 5'trifosfat grubu içeren ssRNA tarafından da aktive edilir (89). PKR, ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF2'nin bir alfa alt birimini bir serin-threonin kinaz ile fosforile eder, böylece hücresel ve viral mRNA'ların translasyonunu engeller. 2-5 OAS, kısa 2'5' oligoadenilatların sentezini katalizler ve latent endoribonükleaz RnazL'yi aktive ederek viral ve hücresel RNA'ları parçalar. ADAR 1, inozin elde etmek için hedef dsRNA'ların adenozinin deaminasyonunu katalizler (86). Sonuç olarak, sekonder yapı nedeniyle istikrarsız olan bir AU baz çifti daha az kararlı IU baz çiftine dönüştürülür ve mutasyonlar viral genomun içinde birikir. Viperin, endoplazmik retikulüm (ER) membranında lokalizedir ve lipid yığınının oluşumunu bozmaktadır ki bu da replikasyon veya tomurcuklanma için bazı virüslerin ihtiyaç duyduğu bir durumdur. P56 ökaryotik translasyon

başlatma faktörü eIF3'ün ökaryotik başlatma faktörü 3e (eIF3e) alt birimini bağlar. Bunun fonksiyonu mutemelen eIF3 üçlü kompleks oluşumunun başlamasını translasyon seviyesinde durdurmak ve viral RNA translasyonunu bastırmak için bir inhibitör olarak işlev görmektir. ISG20, spesifik olarak IFN ile indüklenen bir 3' 5' ekzonükleazla in vitro olarak ssRNA'yı parçalar (86,90).

3.3. İnterferon Sentezi ve KKKA Virüsünün İmmün Sistemden Kaçışı

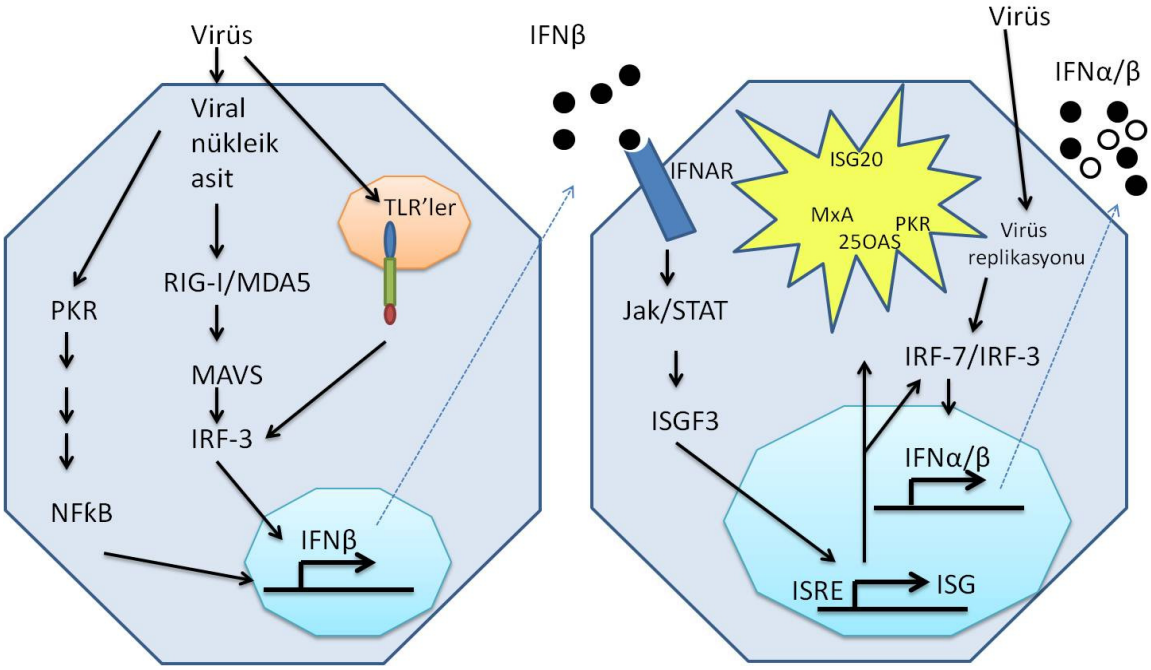
TipI IFN'lara antiviral bileşik olarak gittikçe artan bir ilgi vardır ve KKKA virüsü interferon (IFN) duyarlı virüs listesine yakın zamanda eklenmiştir. Bununla birlikte, KKKA da dahil olmak üzere herhangi bir viral hemorajik ateşe karşı IFN'un etkisini araştıran ve bugüne kadar yapılan herhangi bir klinik çalışma mevcut değildir. En fazla ilerleme KKKA virüs replikasyonunu etkileyen ISG'ler ile ilgili olarak elde edilmiştir. *Bunyavirüs*'lerin diğer üyelerinde de gözlendiği şekilde, virüse karşı IFN'nin antiviral aktivitesine MxA önemli katkı sağlar. MxA proteininin enfekte hücrelerin perinükleer bölgelerinde virüsün nükleokapsid proteini ile etkileştiği ve birlikte yerleştiği bulunmuştur. Bu, muhtemelen virüsün replikasyonunu inhibe etmekten sorumlu bir etkileşimdir (85). Diğer Bunyavirüslerde de bu etkileşim mevcuttur. MxA'nın, virüse karşı IFN aktivasyonunu artırıcı tek ajan olmayıp, birçok interferon situmule eden gen (ISG), interferon indükleyen gen-10 (IP-10) ve dsRNA bağımlı kinaz olan RNA aktive eden protein kinaz (PKR)'ın da katkıları vardır (89). Böylece, görünüşe göre enfeksiyonla mücadele için KKKA virüsüne karşı antiviral aktivite ile uyum içinde hareket eden birkaç ISG vardır. Retionik asid indükleyen gen-1 (RIG-1) ve melanoma diferansiyonu ile ilişkili gen-5 (MDA-5), RNA helikaz aktivitesine sahiptir ve virüsün overlaping olmayan farklı yerlerini tanır. İnterferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3), IFN-β promoter aktivasyonunda merkezi rol oynar. RIG-1 trifosfat gruplarına, 5'ucunda keplenmemiş tek zincirli RNA (ssRNA) ve kısa çift zincirli (dsRNA) moleküllere de bağlanma yeteneği vardır. RIG-1 ve MDA-5 viral RNA ya bağlandıktan sonra IRF-3 fosforile olur. Fosforile olan IRF-3 homodimerleri nükleusa taşınır ve IFN-β mRNA sentezini başlatır. Bu birinci dalga ile artan interferon IRF-7 ekspresyonunu tetikler. IRF-7 fibroblastlarda düşük bir miktarda hazır olarak vardır. IRF-7 aktivasyonu ve ekspresyonu pozitif feed-back halkasına liderlik eder ki bu bazı IFN-α subtiplerinin sentezini başlatır. Bu da ikinci IFN dalgasını oluşturur (89).

Güçlü bir şekilde tip I IFN ile inhibe edilmesine rağmen, KKKA hala konakta yıkıcı bir etki oluşturmaktadır. Bu farklılığın büyük olasılıkla açıklaması, virüs kaynaklı IFN'un tedavi edici olduğu ancak sadece bir profilaktik etki oluşturduğu veya enfekte hücreler tarafından IFN'un yetersiz üretildiğidir. Nitekim son veriler bu mekanizmaların her ikisinin

de etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada IFN'un, zaten gelişmiş olan bir KKKA enfeksiyonuna karşı anlamlı bir aktivitesi olmadığı gösterilmiştir (92). Adı geçen aynı çalışmada enfeksiyon etkeni alındıktan 1 saat sonra 1000 U / ml IFN ile tedavi verilmesi etkisiz olarak bulunmuş, ancak enfeksiyondan önce aynı doz IFN'un uygulanması durumunda KKKA virüs replikasyonunu önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür. Buna ek olarak, KKKA virüsü birkaç bağımsız strateji ile IFN sentezi indüksiyonuna karşı koymaktadır. İlk olarak, akla gelebilecek olan, diğer negatif iplikli RNA virüsleri ve bunyavirüslere benzer şekilde KKKA virüsü de önemli miktarda IFN indükleyici molekülü dsRNA üretememektedir. İkincisi, bulduğumuz bu önemli RIG-I sinyal yolu 5'trifosfat taşıyan viral ssRNA tarafından tetiklenmektedir ve bu yol KKKA genomu tarafından aktive edilmemektedir. Oysa bununla ilişkili olarak Rift Valley ateşi virüsünün (*RVFV*) ssRNA genomu 5'trifosfat grubu içermektedir ve RIG-I aracılığıyla IFN indüksiyonunu indüklemektedir, KKKA virüs genomu bir nötr RIG-I 5'monophosphate içermektedir. Büyük bir olasılıkla KKKA virüsü genomun replikasyonu sırasında 5'trifosfat grubunu parçalayarak RIG-I tarafından tanınmaktan kaçınmaktadır. Bunun sonucunda, KKKA virüsü ile enfekte olan hücrelerin IFN indüksiyonu zayıf ve nispeten geç oluşmaktadır. Dolayısıyla Bunyaviridae ailesi üyeleri RIG-I yolunu inhibe eden iki radikal ve farklı strateji geliştirmişler gibi görünmektedir. Oysa, RVFV özel bir anti-IFN faktör oluşturarak IFN indüksiyonunu inhibe eder, ki bu da yapısal olmayan NSs proteinidir. Diğer bunyavirüsler de benzer kategorilere ayrılmaktadır örneğin La Crosse virüs IFN indüksiyonunu engelleyen bir NSs proteini oluştururken Hantaan virüsü genomun 5'ucunda bir monofosfat grubu içermektedir (92).

Bununla birlikte, KKKA virüs parçacıkları ve virüsün RNA dışında IFN aktive edici en az bir anti-IFN faktöre sahipmiş gibi görünmektedir. UV ışını kullanılarak yapılan deneyler IRF-3 bağımlı ISG56 geninin, UV ile inaktive edilen KKKA virüs parçacıklar tarafından enfeksiyon etkeninin alınmasından hemen sonra erken dönemde zayıf bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir. Sağlam virüs ile enfekte edilmiş hücrelerde ise, aksine ISG56'nın uyarılması 14 saatlik bir gecikmeyle meydana gelmiştir ve bunun sebebi şimdiye kadar bulunamamıştır ancak yapılan dizi analizler KKKA virüsünün S segmentinde kodlanmamış ek bir gene sahip olduğunu düşündürmektedir (veriler gösterilmemiştir). Dolayısıyla buna karşılık gelen protein ürünü henüz tespit edilememiştir. Bunun yanı sıra, bu KKKA virüsünün L proteininin doğuştan gelen bağışıklıktan kaçınmayı sağlayan bir over tümörü (OTU) benzeri etki alanı içerdiği kanıtlanmıştır. Bu etki alanı ilişkili olan Nairovirüslerden Dugbe virüsünün L proteini üzerinde ve Nairobi koyun hastalığı virüsünde gelmiştir. Bu doğrultuda, sağlam

virüsle IRF-3 aktivasyonundaki gecikme, nükleer translokasyon ölçülmesiyle analiz edilmiş ve bu süre yaklaşık olarak 20 saat olarak bulunmuş. Bu da KKKA virüsünün IRF-3 aktivasyonu ve dolayısıyla ISG56'nın uyarılmasına zıt bir faktör oluşturduğunu göstermektedir. Bu faktör mevcuttur ancak filogenetik olarak daha uzak olan Phlebovirus RVFV'de yoktur. OTU etki alanı dekonjuge Ubiquitin (Ub) proteazlar süperailesine aittir ve prokaryotlarda, ökaryotlarda ve virüslerde bulunur. Ub ve interferon ile uyarılmış gen ürünü 15 (ISG15) diğer proteinlere kovalent bağla konjuge edilmiş kısa proteinlerdir ve doğuştan antiviral yanıtlara aracılık eder. Ayrıca, bir viral OTU etki alanı ihtiva eden proteinin ekspresyonu, ISG15 ve antiviral etkileri antagonize eder ve NF-κB bağımlı sinyali engeller. Böylece, KKKA virüsünün interferonlardan ve diğer bağışıklık sistemlerinden kaçınmak için bir dizi stratejiler geliştirdiği ve doğal immün cevaba karşı önlem aldığı düşünülmektedir. RIG-I'in tanımasından, viral genomdan 5'trifosfat grubunun uzaklaştırılması ile kaçınabileceği, IRF-3 aktivasyonu aracılığıyla oluşan tanınmadan kaçınması ise henüz tespit edilmemiş bir viral faktör tarafından geciktirildiği düşünülmektedir (92) (Şekil 4).



Şekil 3.3. TipI IFN'ların bir viral enfeksiyonu takiben oluşan indüksiyon, sinyalizasyon ve aksiyonu. Viral nükleik asitlerin RIG-I/MDA5, PKR ve TLR yolakları tarafından Intra-ve ekstraselüler olarak tanınması.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dalı'nda Nisan-2010 ile Eylül-2011 tarihleri arasında KKKA hastalığı tanısı ile takip edilen erişkin erkek ve kadın hastalar arasından TC. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'nın endemik bölgelerde olası vaka tanımına uyan ve aynı merkezde PCR yöntemiyle KKKA virüsü pozitif olarak saptanan hastalar dahil edildi. Bu çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığından 29.09.2010 tarih ve 10/146 sayılı karar ile izin alınmıştır. Çalışmaya KKKA tanısı alan, yatırılarak takip ve tedavisi yapılan 100 hasta alındı. Ayrıca kontrol grubu olarak sağlıklı kadın ve erkeklerden oluşan, herhangi bir şikayeti bulunmayan toplam 74 kişi seçilerek serumları ayrıldı.

YDP skorlamasının belirlenmesi için hastalardan alınan kan örneklerinde tespit edilen trombosit sayısı, INR değeri, PTZ değeri, fibrinojen ve D-Dimer değerleri puanlanarak toplanır. Tespit edilen bu değerin yüksekliğine göre hastalığın ağırlığı tahmin edilir (73).

4.1. Serum örneklerinin elde edilmesi

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dalı'na Nisan-2010 ile Eylül-2011 tarihleri arasında KKKA hastalığı ön tanısı ile yatırılarak takip ve tedavisi yapılan erişkin kadın ve erkek hastalar kliniğe yatırılma tarihlerine göre sırayla kaydedildi. Kaydedilen hastalar öncelikle ağır ve hafif olmak üzere iki gruba ayrıldı. Ağır grup hastalar Swanepoel ciddiyet kriterlerine göre seçildi (33-112). Ağır gruptaki hastalar grup1, hafif gruptaki hastalar ise grup2 olarak adlandırıldı. Takibi sırasında hastalardan 25'i kaybedildi. Ağır grupta olup ölen hastalar grup1a ve ağır grupta olup yaşayan hastalar ise grup1b olarak adlandırıldı. Grup1a'daki hastalardan sadece yatışının 1. gününde grup1b ve grup2'deki hastalardan ise hem yatışının 1. gününde hemde 5. gününde kan alındı. Alınan kanlar 15-20 dakika dinlendirildikten sonra santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar eppendorf tüplere ayrılarak tüm örnekler –80 ^{0}C soğutucuda saklandı.

Tip 1 inferferonlar Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılırken, viral yük için, –80 ^{0}C de saklanan hasta serumları kuru buz bulunan taşıma paketi şeklinde İONTEK Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Araştırma Geliştirme San. Ve Tic. A.Ş. laboratuvarına nakledilererek RT-Time PCR yöntemiyle çalışıldı.

4.2. ELISA yöntemiyle IFN-α çalışılması

4.2.1. Ayıraçların hazırlanması

Yıkama solüsyonu (Wash Buffer): Önce konsantre yıkama solüsyonu kristalleşmemesi için oda sıcaklığında kristaller eriyene kadar hafifçe sallandı. Sonra 50 ml konsantre yıkama solüsyonu üzerine 450 ml distile su eklenerek 500 ml yıkama solüsyonu hazırlandı.

Streptavidin-HRP Konjugat solüsyonu: Pipetle 12 microlitre konjugat üzerine 11.988 ml seyreltme tamponu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne eklendi ve 1000 kat konsantre stok çalışma çözeltisi hazırlandı.

Pozitif kontrol solüsyonu: 1.0 ml pozitif kontrol konsantresi seyreltme solüsyonu ile sulandırılarak hazırlandı.

Antikor tespit konsantresi solüsyonu: Pipetle 105 microlitre konsantre üzerine 10.395 ml seyreltme solüsyonu 15 ml'lik bir santrifüj içine eklendi ve 1000 kat konsantre stok çalışma çözeltisi hazırlandı.

4.2.2. Çalışma yöntemi

ELISA yöntemiyle yapılan çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'da yapıldı. Öncelikle –80 ^{0}C'de saklanan serum örnekleri işlemden önce oda sıcaklığında eritildi. AB human IFN-Alpha ELISA kıt isimli ticari kitlerinin çalışma rehberinde belirtildiği gibi oda ısısında erimeleri sağlandı. Bundan sonraki tüm çalışma adımları ismi anılan rehberde belirtildiği şekilde yapıldı. Standartların santrifüjü ve diğer tüm santrifüj işlemleri nüve, NF 048 marka santrifüj cihazıyla yapıldı.

1- Daha önce belirtildiği gibi tüm reaktifler ve çalışma standartları hazırlandı.
2- Plak çerçevesinde fazla olan mikroplak şeritleri çıkarıldı.
3- Tüm kuyucuklara hasta serumu, standartlar ve pozitif kontrol şu şekilde dağıtıldı; çalışılma için plaktaki ilk 88 kuyucuğa 100 µl hasta serumu, sonraki 6 kuyucuğa aynı miktarda standart ve daha sonraki 1 kuyucuğa pozitif kontrol eklendi ve en son kuyucuk blank (boş) olarak bırakıldı.
4- Sonra kuyucuklara 30 µl sample diluent (örnek seyreltici) eklendi.
5- Ardından bu kuyucuklara (Blank wells) 70 µl seyrltici tampon (dilution buffer) ilave edildi.
6- Daha sonra her kuyucuğa 70 µl standart solüsyonu ve pozitif kontrol eklendi ve ardından plaklar ısı ve ışıktan etkilenmemesi için aüminyum folyo ile kapatıldı ve oda ısısında otomatik çalkalayıcı cihaz [Hybrıd Capture System (DIGENE)] üzerinde 2 saat süreyle inkübe edildi.

7- 2 saatin bitiminde aspire edildi ve sonra plaklar otomatik yıkayıcı (Organon Teknıka Microwell System Washer 200) kullanılarak önce aspire edildi ve sonra yıkandı. Yıkama işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Sonra plaklar ters çevrildi ve kağıt havlu ile kurutuldu.

8- Ardından kuyucuklara 100 µl tespit antikor (Detection antibody) solüsyonu eklendi ve aynı şekilde kapatılarak otomatik mikro çalkalayıcı üzerinde 2 saat süreyle inkübe edildi.

9- Yine 2 saatin sonunda 7. adımda belirtildiği şekilde aspire edildi ve yıkandı.

10- Sonra tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP konjugat solüsyonu eklendi ve otomatik çalkalayıcı üzerinde aynı şartlarda 60 dakika süreyle inkübe edildi.

11- Sürenin sonunda 7. adımdaki gibi aspirasyon ve yıkama işlemi tekrarlandı.

12- Sonra 100 µl substrat solüsyonu eklenerek oda ısısında ışıktan koruyarak 5 dakika inkübe edildi.

13- Ardından her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu (stop) eklendi.

14- En son olarak 15 dakika içinde, 450 nm dalga boyuna ayarlanmış, ELISA otomatik okuyucuda (Bio-Tek, Bio-Kinetics Reader Model EL-312 Microplate, Winooski) optik dansite (OD) değerleri belirlendi. IFN-α değerler belirlendikten sonra yazıcı (Epson LX-400) kullanılarak optik dansite değerlei yazdırıldı.

15- En sonunda belirlenen optik dansite değerleri Curve expert sisteminde yerleştirilerek IFN-α değerleri tespit edildi.

4.3. ELISA yöntemiyle IFN-β çalışılması

4.3.1. Ayıraçların hazırlanması

Yıkama solüsyonu (Wash Buffer): Önce konsantre yıkama solüsyonu kristalleşmemesi için oda sıcaklığında kristaller eriyene kadar hafifçe sallandı. Sonra 20 ml konsantre yıkama solüsyonu üzerine distile su eklenerek 500 ml yıkama solüsyonu hazırlandı.

Standart solüsyonu: Standart şişesi 30 sn, 7500 (6.000-10.000) devirde santrifüj edildi. Daha sonra 1.0 ml konsantre standart numune seyreltici ile sulandırıldı. Elde edilen bu sulandırılmış standart 2000 pg/ml'de bir stok solüsyon oluşturur. Seyreltilmemiş standartlar yüksek bir standart gibi (2.000 pg/ml) görev görür. Numune seyrelticisi ise sıfır standart (0 pg/ml) gibi fonksiyon görür.

Biyotin-antikor solüsyonu: Açmadan önce şişe santrifüj edildi. Çalışma konsantrasyonu Biotin-antikor seyreltici (1:100) kullanılarak seyreltildi.

HRP(horseradishperoksidaz)-Avidin solüsyonu: Açmadan önce şişe santrifüj edildi. Çalışma konsantrasyonu HRP-Avidin seyreltici (1:100) kullanılarak seyreltildi.

4.3.2. Çalışma yöntemi

Öncelikle –80 ^{0}C'de skaklanan serum örnekleri işlemden önce oda sıcaklığında eritildi. Alınan serumlar CUSABIO Human Interferon β (IFN- β/IFNβ) ELISA kit isimli ticari kitlerin çalışma rehberinde belirtildiği gibi oda ısısında erimeleri sağlandı. Bundan sonraki tüm çalışma adımları ismi anılan rehberde belirtildiği şekilde yapıldı. Tüm reaktifler pipetle kuyucuklara doğrudan ve iç duvara temas etmeden ilave edildi. Standartların santrifüjü ve diğer tüm santrifüj işlemleri nüve, NF 048 marka santrifüj cihazıyla yapıldı.

1- IFN- β çalışması için rehberde belirtildiği gibi tüm reaktif ve standartlar hazırlandı.
2- Tüm kuyucuklara hasta serumu, standartlar ve pozitif kontrol şu şekilde dağıtıldı; çalışılma için plaktaki ilk 88 kuyucuğa 100 µl hasta serumu, sonraki 6 kuyucuğa aynı miktarda standart ve daha sonraki 1 kuyucuğa pozitif kontrol eklendi ve en son kuyucuk blank (boş) olarak bırakıldı.
3- Plak yapışkan şerit ile kapatıldı ve etüvde 37 ^{0}C de 2 saat süreyle inkübe edildi.
4- Sürenin sonunda plak etüvden çıkarılarak sıvıyı kuyucuklardan uzaklaştırmak için döküldü ancak rehberde belirtildiği gibi asla yıkanmadı.
5- Her bir kuyucuğa 100 µl Biotin-antikor çalışma solüsyonundan eklendi aynı şekilde etüvde 37^{0}C de 1 saat süreyle inkübe edildi.
6- 1 saatin sonunda etüvden çıkartıldı. Tüm kuyucuklar otomatik yıkayıcı (Organon Teknıka Microwell System Washer 200) kullanılarak önce aspire edildi ve sonra yıkandı. Yıkama işlemi aymı şekilde toplam 3 kez tekrarlandı. Levha üzerinde kalan damlalar kağıt havlu kullanılarak uzaklaştırıldı.
7- Daha sonra tüm kuyucuklara 100 µl HRP-avidin solüsyonu eklendi ve üzeri yapışkan bantla kapatılarak, etüvde 37^{0}C de 1 saat süreyle inkübe edildi.
8- 1 saat sonra etüvden çıkarılarak 6. adımda beliritildiği gibi aspire edilip yıkandı, bu yıkama işlemi de toplamda beş kez aynı şekilde tekrar edildi.
9- Sonra kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklendi ve etüvde, 37 ^{0}C de 20 (15-30) dakika süreyle inkübe edildi.
10- Daha sonra plaklar etüvden çıkarıldı ve ve oda ısısında hava akımından ve diğer sıcaklık dalgalanmalarından karanlık bir ortamda tutuldu.
11- Sonra her bir kuyuya 50 µl durdurma (Stop Solution) çözeltisi eklendi ve renklerin iyice karışması için belirtildiği gibi plaklara yavaşça dokunuldu.

12- En son olarak 20 dakika içinde, 450 nm dalga boyuna ayarlanmış, ELISA otomatik okuyucuda (Bio-Tek, Bio-Kinetics Reader Model EL-312 Microplate, Winooski) optik dansite (OD) değerleri belirlendi.

13- IFN-α değerler belirlendikten sonra yazıcı (Epson LX-400) kullanılarak optik dansite değerlei yazdırıldı.

14- En sonunda belirlenen optik dansite değerleri Curve expert sisteminde yerleştirilerek IFN-α değerleri tespit edildi.

4.4. PCR yöntemiyle viral yük tespit yöntemi

PCR yöntemiyle viral yükün tespit edilmesi için numaralandırılıp –80 ^{0}C de saklanan hasta serumları çıkarılarak kuru buz bulunan taşıma materyaliyle çalışmanın yapılacağı merkeze götürüldü ve aşağıda anlatıldığı şekilde çalışma yapıldı.

4.4.1. Serumdan DNA/RNA izolasyonu

Kullanılan İzolasyon Cihazı: Fluorion Mag 16 ekstraksiyon sistemi

Kullanılan İzolasyon Kiti: Fluorion® Mag 16 Viral Nucleic Acid Extaction Kiti

Fluorion® Mag 16 Viral Nucleic Acid Extaction Kit'in tüm elemanları kit açılana kadar oda sıcaklığında saklandı.

1. Kitin ilk kullanımından önce Carrier RNA ve Proteinaz K sulandırıldı.
2. Carrier RNA tüpüne 1.0 ml Rnaz'dan arındırılmış su eklendi ve vortex ile karıştırıldı. Hazırlanan Carrier RNA solüsyonu (1 mg/ml) –20 °C'de saklandı.
3. Proteinaz K tüpüne 1.1 ml PK Saklama Tamponu eklendi ve vortex ile karıştırıldı. Hazırlanan Proteinaz K solüsyonunu (10 mg/ml) 4°C'de saklandı.
4. Tam otomatik izolasyon robotu aracılığıyla gerçekleştirilen izolasyon çalışması için Mag16 Viral Nucleic Acid Extaction kiti (kartuş kodu: 201) kullanıldı.
5. Her bir örnek için 1 mg/ml'lik Carrier RNA solüsyonundan 10 ul, 10 mg/ml'lik Proteinaz K solüsyonundan 20 ul 1,5'luk örnek tüpüne ilave edildi.
6. Bu karışımın üzerine 400 ul serum koyuldu. Ardından örnekler Mag 16 cihazına yüklendi.
7. Çalışma cihazda 56 dakikada tamamlandı.

4.4.2. Real Time PCR reaksiyonu

Kullanılan cihaz: Fluorion Deteksiyon Sistemi

Kullanılan Kit: Fluorion CCHFV QNP 1.0 (Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü RNA Kantitasyon Kiti)

4.4.2.1 Çalışma Prensibi

Real-Time PCR sisteminde kullanılan bu kit ile hasta serumundaki CCHFV RNA miktarı hızlı ve hassas biçimde saptandı. *fluorion* CCHFV QNP 1.0 pratik kullanımı nedeniyle kontaminasyon riskini en aza indirgendi. PCR sonrası analizlere gerek duyulmadan sonuçlar anında alındı.

4.4.2.2. Çalışma protokolü

Serumdan total nükleik asitler izole edildi. CCHFV genomunun 140 baz çifti uzunluğundaki bölgesi, real-time PCR cihazında çoğaltıldı. PCR ürünü, floresan bir boya olan SYBR-green aracılığıyla reaksiyon sırasında görüntülendi. Floresan miktarındaki artış, oluşan PCR ürün miktarı ile doğru orantılıdır ve real-time PCR cihazı tarafından gerçek zamanlı olarak ölçüldü. DNA'ya bağlı SYBR Green I'in yaydığı floresans PCR ürünü biriktikçe artar; sinyalin arka plan seviyesinin üzerine çıktığı ve ayırdedilebilir hale geldiği noktaya eşik döngüsü (threshold cycle; C_T) adı verilir. Başlangıç miktarının logaritması ile eşik döngüsü arasında doğrusal bir ilişki vardır. Buna bağlı olarak, virüs miktarı bilinmeyen örnekler başlangıç miktarı belirli standartlar aracılığı ile oluşturulan standart eğri yardımı ile kantite edildi.

1. Reaksiyon sırasında, reverse transcription ve PCR aynı tüp içinde gerçekleştirildi.
2. Her iki aşama için gereken reaktifler reaksiyonun başında tüpe koyuldu ve böylece revers transkripsiyon bittikten sonra tüpü açmak ve pipetleme yapmak gerekmedi.
3. Enzim termal protokolün başına eklenmiş olan 95 °C'de 15 dakikalık bir inkübasyon sonrasında aktif hale getirildi. Bu inkübasyon aynı zamanda revers transkriptaz enzimlerini de inaktive eder ve böylece revers transkripsiyon ve PCR'ın zamansal olarak birbirinden ayrılması ve iki aşamanın aynı tüpte gerçekleşmesi sağlanmış oldu.
4. Oluşan spesifik ürünün erime eğrisi analizi yapıldı. İkili sarmal yapıdaki DNA molekülünden iplikcikler birbirinden ayrıldı..
5. Erime sıcaklığını büyük ölçüde baz dizisi belirlediğinden farklı dizilere sahip DNA moleküllerinin Tm değerleri birbirinden farklıdır. Erime eğrisi analizinde, ikili sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturuldu.
6. İplikçikliklerin birbirlerinden ayrılmaları sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan tepecikler aracılığıyla gözlemlendi. Erime eğrisi analizi hem kantitatif, hem de kalitatif analizlerde kullanılır.

7. SYBR Green I gibi seçici olmayan boyalar, çoğaltılması hedeflenen bölge yerine non-spesifik PCR ürünlerine ya da sıklıkla rastlanan primer dimerlerine de bağlanır. Bu farklı DNA moleküllerinin Tm'leri de birbirlerinden farklıdır ve erime eğrisinde farklı sıcaklıklarda tepecikler oluşur. Böylece erime eğrisi analizi, çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirir.
8. Her örnek için amplifikasyonun ilk görüldüğü döngü, "döngü eşik değeri" (cycle threshold) olarak belirlendi.
9. Kitte kullanılan materyallerden her biri, nükleik asit kontaminasyonu olasılığına karşı test edildi.
10. Aşağıdaki miktarlar 1 reaksiyon için geçerlidir. Bu miktarları örnek adedimiz ile çarparak ana karışıma koyacağımız miktarları hesaplandı. Temiz bir tüpte hazırlanan ana karışımı mikropipetle karıştırarak PCR tüplerine bölüştürüldü. üzerlerine DNA örnekleri pipet ile ilave edildi.

4.4.3. Kullanılan solüsyonlar(SYBR Green I Mix) ve PCR'ın Hazırlanması

SYBR Green I Mix

HotStarTaq DNA Polimerazı: HotStarTaq DNA Polimerazı *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş, E.Coli'ye klonlanmış 94 kDa'luk rekombinant DNA polimerazın modifiye edilmiş bir formudur. Enzim inaktif bir formda verilir. Bu özelliği sayesinde hatalı bağlanan primerlerin ya da primer-dimerlerin önüne geçilir ve daha yüksek PCR spesifitesi ve kantitasyon hassasiyeti sağlanır.

QuantiTect SYBR PCR Tamponu: Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgCl_2$ içerir, 20ºC'de pH 8.7 dir.

dNTP Karışımı: Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP ve dTTP/dUTP içerir.

Deteksiyon Mix 1: Deteksiyon Mix 1, CCHFV genomuna özgü forward ve reverse primerler (25 uM) içerir.

RT Mix: E.Coli'de ekprese edilen rekombinant heterodimerik Omniscript ve Sensiscript revers transkriptazların optimize edilmiş karışımını içerir. Enzimlerin en uygun çalışma sıcaklıkları 50 ºC'dir.

Kantitasyon Standartları: Fluorion CCHFV QNP 1.0 Real-Time PCR Kiti içerisindeki kantitasyon standartları CCHFV DNA'sı içermektedir. Standartlar önceden izole edilmiş örnekler gibi ele alınmalı ve diğer örneklerle aynı miktarda (5 ul) kullanılmalıdır. Standartların değerleri (kopya/ml) olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

4.4.3.1. PCR'ın Hazırlanması

1. Her çalışmaya örneklerin yanı sıra 4 dış kantitasyon standardı ve negatif kontrol (PCR-grade su) dahil edildi.
2. Aşağıdaki miktarlar 1 reaksiyon için geçerli kabul edildi. Yani bir örnek için kit içerisinden çıkan PCR Mix'ten 12.5 ul, Deteksiyon mix 1'den 4.5 ul, Rt-Mix'ten 0.25 ul, su'dan 2,75 ul.
3. Bu miktarları örnek aded ile çarparak ana karışıma koyulacak miktarlar hesaplandı.
4. Temiz bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpte hazırlanan bu ana karışım mikropipetle karıştırılarak 0,2 ul'lik PCR tüplerine bölüştürülmedir.
5. Üzerlerine 5 ul DNA örnekleri pipetle ilave edildi.
6. Ardından tüpler (standartlar, örnekler ve negatif kontrol) cihaza yüklenir, tanımlamalar yapılır ve termal döngü seçilerek program başlatılır.

PCR Mix	12.5 µl
Deteksiyon Mix 1	4.5 µl
RT-Mix	0.25 ul
dH_2O	2.75 µl

Her kuyucuğa;

Örnek DNA/	20.00µl
Pozitif Kontrol	5.00µl
TOPLAM	25.00µl

4.4.3.2. Fluorion Deteksiyon Sistemi'nin Programlanması

Fluorion CCHFV QNP 1.0 Real-Time PCR Kiti termal protokolü, bir revers transkripsiyon, HotStarTaq DNA Polimerazın aktivasyonu için bir ilk denatürasyon, iki aşamalı amplifikasyon döngüleri ve son bir inkübasyondan oluşur. Real-Time PCR verileri, amplifikasyon döngüsünün üçüncü aşamasında toplandı.

50^0C 30:00 dk.
95^0C 13:30 dk.
94^0C 00:30 dk.
56^0C 00:45 dk. } 50 döngü

72^0C 00:30 dk.

76^0C 00:30 dk. Real-Time Veri Toplama Aşaması

60^0C 01:00 dk.

60^0C 00:15 dk. 70 döngü (+ 0.5^0C/döngü)

22^0C ∞

Fluorion Kitleri kullanılarak bir Real-Time PCR reaksiyonu başlatılmadan önce şu aşamalar tamamlandı:

1. Kullanılacak filtre seçildi (FAM)
2. Örnek, standart, negatif kontrol içeren kuyucuklar tanımlandı, standartlara değer verildi,
3. Doğru termal protokol seçildi

4.5. Veri Analizi

Termal protokol sona erince, Fluorion Deteksiyon Sistemi yazılımı baseline döngülerini ve eşiği otomatik olarak hesaplandı. Eşik, tüm örneklerin baseline döngülerinin üzerindeki standart sapmasının 10 katı olarak hesaplandı ve standart eğri mümkün olan en yüksek korelasyon katsayısına sahip olacak şekilde ayarlandı. Standart eğri (Eşik Döngüsü-Log Başlangıç Miktarı) tanımlanmış standartlardan elde edilen veriler kullanılarak oluşturuldu.Reaksiyon sona erdikten sonra her örnek için erime eğrisi (Melt Curve) analizi yapıldı. Pozitif örnekler 80°C ± 2°C'de bir erime tepeciği verirler, negatif örneklerde ise erime tepeciği gözlenmez. 74,5°C ± 2°C aralığının altında ya da üstünde erime tepeciği veren örnekler spesifik olmayan PCR ürünlerinden kaynaklanmaktadır ve pozitif olarak değerlendirildi.

4.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın verileri Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Versiyon 14.0 istatistiksel paket programına yüklenerek, verilerin değerlendirilmesinde; iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, korelasyon analizi, eşler arasındaki farkın önemlilik testi, cinsiyet yönünden Khi-kare testi, varyans analizi, yaşlar açısından Kruskal Wallis testi Tukey testi kullanılmıştır. ROC analizi yapılarak sensitivite ve spesifite değerleri hesaplanmış olup verilerimiz tablolarda aritmetik ortalama±standart sapma, birey sayısı ve yüzdesi şeklinde belirtildi ve yanılma düzeyi α=0,05 olarak alınmıştır.

5. BULGULAR

Bu çalışma, Nisan-2010 ile Eylül-2011 tarihleri arasında Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı'na başvuran, TC. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'nın endemik bölgelerde olası vaka tanımına uyan (100), aynı merkezde PCR yöntemiyle KKKA virüsü pozitif olarak saptanan, yatırılarak takip ve tedavi edilen 100 hastada yapıldı. Swanepoel ciddiyet kriterlerine göre hastalar hafif ya da ağır olarak gruplandırıldı (33). Buna göre başlangıçta çalışmaya alınan hastaların 64 (% 64)'ü ağır grup(Grup1) hasta, 36 (%36)'sı ise hafif grup (Grup2) hasta olarak tanımlandı.

Çalışmaya dahil edilen 100 hastanın 58 (% 58)'i erkek, 42 (%42)'si ise kadın olgulardan oluşmakta ve yaşları 17 ile 80 (ortalama 49.86±14.50) arasında değişmekte idi. Grup1'de yer alan 64 hastanın 24 (% 37.5)'ü kadın, 40 (62.5)'ı ise erkek olgulardan oluşurken, grup2'deki hastaların 18 (% 50)'i kadın, 18(% 50)'i ise erkek olgulardan oluşmakta idi. Grup1'deki hastaların yaşları 17 ile 80 (ortalama 51.43±16.77), grup2'deki hastaların yaşları ise 26 ile 72 (ortalama 49.52±12.23) arasında değişmekte idi. Kontrol grubu olarak seçilen 74 hastanın 38(%51.4)'i erkek, 36(%48.6)'sı ise kadın olgulardan oluşmakta idi. Kontrol grubunda yer alan 74 hastanın yaşları 21 ile 70 (ortalama 47.00±12.10) arasında değişmekte idi. Grup1, grup2 ve kontrol gruplarına dahil edilen vakalar arasındaki yaş ve cinsiyete göre farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$) (Tablo5.1).

Çalışmaya alınan ve grup1 ya da grup2'de yer alan hastaların ortalama hastaneye yatmadan önceki hastalık süresi ve bazı laboratuar parametreleri karşılaştırıldı (Tablo5.1). Başlangıçta çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen ortalama serum ALT, AST, LDH, trombosit, fibrinojen ve D-dimer seviyeleri grup1 hastalarda grup2 hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek idi. ($p<0,05$). Yine başlangıçta çalışmaya alınan hastaların ortalama kan lökosit düzeyi, protrombin zamanı ve INR değerlerini de karşılaştırdık. Grup1 ve grup2'deki vakalarda tespit edilen lökosit sayısı, protrombin zamanı ve INR değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Hastaların şikâyetlerinin başlamasından sonra hastaneye başvurmasına kadar geçen süre yönünden değerlendirildiğinde ise grup1 ve grup2'deki hastalar arasındaki istatistiksel fark önemsiz olarak tespit edilmiştir (4,8'e karşılık 3,8 gün) ($p>0,05$). Ortalama YDP skorları açısından her iki grup hastalar ayrı ayrı hesaplanarak karşılaştırıldı. Grup1'deki hastaların ortalama YDP skoru 3.46±1.06, grup2'deki hastaların ise 2.11±1.06 olarak bulunmuştur. YDP

skoru, grup1'de grup2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 5.1. Çalışmaya alınan hastaların yaş, cinsiyet, ortalama hastaneye yatmadan önceki hastalık süresi ve bazı ortalama laboratuar parametrelerin karşılaştırılması.

	Grup1 64	Grup2 36	Kontrol 74	P değeri
Yaş (yıl) , ortalama	51,43 ± 16,77	49,52 ± 12,23	47,00±12,10	0,083
Cinsiyet,Erkek, n (%)	40 (62,5)	18 (50)	38 (51,4)	0,330
Hastalık başlangıç-başvuru arasındaki süre(gün), ($\overline{X}$ ±S)	4,81±1,78	3,80±1,30		0,928
ALT (min-max)	142,00 (34,00-1935,00)	39,50 (11,00-139,00)		0,001
AST (min-max)	337,00 (81,00-3795,00)	95,00 (20,00-452,00)		0,001
LDH, ($\overline{X}$ ± S)	1337,12 ± 1190,27	337,13 ± 239,51		0,001
Lökosit, ($\overline{X}$ ± S)	4441,87 ± 3814,98	3146,33 ± 2743,81		0,076
Trombosit, ($\overline{X}$ ± S)	38750,00±28430,92	92194,44 ± 44785,08		0,001
PT, ($\overline{X}$ ± S)	13,40 ± 4,18	14,33 ± 9,72		0,513
INR ($\overline{X}$ ± S)	1,16 ± 0,34	1,13 ± 0,19		0,576
Fibrinojen, ($\overline{X}$ ± S)	222,34 ± 49,46	262,05 ± 37,62		0,001
D-Dimer (min-max)	3468,00 (212,00-18600,00	907,00 (169,00-10000,00)		0,002
YDP	3,46 ± 1,06	2,11 ± 1,06		0,001
Mortalite	25/64	0/36		

- Grup 1: Ağır gruptaki hastalar
- Grup 2: Hafif gruptaki hastalar

Başvuru anında çalışmaya aldığımız grup1 ve grup2 hastaları somnolans, ajitasyon, organ yetmezliği ve kanama açısından da değerlendirdik (Tablo 5.2.). Grup1'deki hastaların 2'sinde somnolans, 3'ünde ajitasyon, 4'ünde organ yetmezliği, 38'inde ise tek başına yada diğer kanamalarla (dişeti kanaması,burun kanaması, vaginal kanama vs.) birlikte ekimoz görüldü. Grup2'de ise somnolans, ajitasyon ve organ yetmezliği bulguları tespit edilmezken, 14 hastada kanama gözlendi. Bu iki grup arasında yapılan istatistiksel analizde somnolans, organ yetmezliği ve ajitasyon açısından farklılık anlamlı değildi ($p>0,05$). Ancak grup1 ve grup2'deki hastalar kanama açısından karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık anlamlı idi ($p<0,05$).

Tablo 5.2. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (Grup1-grup2) ait bulgu ve belirtilerin karşılaştırması.

		Grup1 (64)	Grup2 (36)	Toplam (100)	P değeri
		n (%)	n(%)	n(%)	
Somnolans		2(3,1)	0(100)	2(2)	0,284
Ajitasyon		3(4,7)	0(0)	3(3)	0,187
Organ yetmezliği		4(6,2)	0(0)	4(4)	0,126
Kanama	Yok	26(40,6)	22(61,1)	48(48)	0,007
	Ekimoz	20(31,3)	8(22,2)	28(28)	
	Ekimoz + diğer	14(21,9	6(16,7)	20(20)	
	Diğer	4(6,3)	0(0)	4(4)	

Hastaların takibi sırasında grup1'deki 64 hastadan 25 (% 39)'i takipleri sırasında kaybedildi. Ölen hastaların yaşları 18 ile 76 (ortalama 56,68 ± 15,59) arasında değişmekte ve 10 (% 40)'u kadın, 15 (% 60)'i ise erkek olgulardan oluşmakta idi. Çalışmaya alınan ve takipleri sırasında ölen hastalar grup1a, ağır grupta olupta yaşayan hastalar ise grup1b olarak adlandırıldı ve sonraki incelemeler buna göre yapıldı. Grup1a, grup1b ve grup2'deki hastalara ait yaş ve cinsiyete ait istatistiksel veriler Tablo 5.3'de verilmiştir. Buna göre grup1a, grup1b grup2'deki hastalar yaş ve cinsiyet açısından değerlendirildiğinde fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$).

Tablo 5. 3. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (grup1a, grup1b ve grup2) ait yaş, cinsiyet ve laboratuar değerlerinin karşılaştırılması .

	Grup1a 25	Grup1b 39	Grup2 36	P değeri
Yaş(yıl), ($\overline{X}$ ± S)	56,68±15,59	48,07 ± 16,82	49,52 ± 12,23	0,075
Cinsiyet, Erkek, (%)	15(60)	25(64,1)	18(50)	0,453
Hastalık başlangıç-başvuru arasındaki süre(gün), ($\overline{X}$ ±S)	4,48±2,02	5,02±1,59	3,80±1,30	0,931
ALT (min-max)	213,00 (43,00-1935,00)	122,00 (34,00-360,00)	39,50 (11,00-139,00)	0,001
AST (min-max)	544,50 (81,00-3796)	302,00 (197,0-1342,00)	95,00 (20,00-452,00)	0,001
LDH, ($\overline{X}$ ± S)	1939,32 ± 1627,74	951,10 ± 532,81	377,13 ± 239,51	0,001
Lökosit, ($\overline{X}$ ± S)	6413,60 ± 4809,02	3177,94 ± 2307,73	3146,33 ± 2743,81	0,002
Trombosit, ($\overline{X}$ ± S)	34640,00±29595,72	41384,61±27724,78	92194,44±44785,08	0,001
PT,($\overline{X}$ ± S)	15,30 ± 5,52	12,24 ± 2,54	14,33 ± 9,72	0,106
INR ($\overline{X}$ ± S)	1,30 ± 0,46	1,08 ± 0,21	1,13 ± 0,19	0,183
Fibrinojen, ($\overline{X}$ ± S)	216,37 ± 54,26	226,02 ± 46,61	262,05 ± 37,62	0,001
D-Dimer (min-max)	7554,00 (531,00-15653,00)	1606,00 (212,00-18600)	907,00 (169,00-10000,00)	0,001
YDP Skoru, ($\overline{X}$ ±S)	3,80 ± 1,12	3,28 ± 0,99	2,11 ± 1,06	0,001

- Grup1a: Ağır grupta olup ölen hastalar
- Grup1b: Ağır grupta olup yaşayan hastalar

Benzer şekilde bu üç gruptaki hastalara ait hastaların ortalama hastaneye yatmadan önceki hastalık süresi ve bazı ortalama laboratuar parametreleri açısından karşılaştırdık. Grup1a, grup1b ve grup2'deki hastalara ait laboratuar verileri Tablo 5.3. te verilmiştir. Tablodaki tespit edilen laboratuar verileri incelendiğinde başvuru anında alınan birinci kan örneklerindeki ortalama serum ALT, AST, LDH, trombosit, fibrinojen, D-dimer, lökosit sayısı ve YDP skoru açısından grup1a ile hem grup1b ve hem grup2'eki olgularda tespit edilen farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Aynı gruplarda bakılan ortalama PT ve INR değerleri açısından bu üç grup karşılaştırıldığında aradaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$). Hastalık şikâyetlerinin başlaması ile hastaneye başvurması arasındaki geçen süre yönünden karşılaştırıldığında ise grup1a, grup1b ve grup2 arasında istatistiksel fark önemsiz olarak tespit edilmiştir (sırasıyla 4.4, 5.0 ve 3.8 gün) ($p>0,05$).

Tablo 5.4. KKKA tanısı ile takip edilen hastalara (grup1a, grup1b ve grup2) ait bulgu ve belirtilerin karşılaştırılması.

		Grup1a 25	Grup1b 39	Grup2 36	Toplam (100)	P değeri
		n (%)	n(%)	n(%)	n(%)	
Somnolans		2(8)	0(0)	0(0)	2(2)	0,047
Ajitasyon		3(12)	0(0)	0(0)	3(3)	0,010
Organ yetmezliği		4(16)	0(0)	0(0)	4(4)	0,002
Kanama	Yok	10(40)	16(41)	22(61,1)	48(48)	0,007
	Ekimoz	6(24)	14(35,9)	8(22,2)	28(28)	
	Ekimoz + diğer	5(20)	9(23,1)	6(16,7)	20(20)	
	Diğer	4(16)	0(0)	0(0)	4(4)	

Çalışmaya aldığımız grup1a, grup1b ve grup2'deki hastaları somnolans, ajitasyon, organ yetmezliği ve kanama açısından da karşılaştırdık. Bu üç gruptaki olgulara ait somnolans, ajitasyon, organ yetmazliği ve kanama ile ilgili bulgular Tablo 5.4. te verilmiştir. Grup1a'daki hastaların 2'sinde somnolans, 3'ünde ajitasyon ve 4'ünde organ yetmezliği tespit edildi. Yine grup1a'daki hastaların toplam 15'inde tek başına ya da diğer kanamalarla (diş eti

kanaması, burun kanaması, vaginal kanama vs.) birlikte ekimoz görüldü. Grup1b ve grup2'de somnolans, ajitasyon ve organ yetmezliği görülmezken, grup1b'deki hastaların 23'ünde ve grup2'nin ise 14'ünde kanama tespit edildi. Bu gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde somnolans, organ yetmezliği, kanama ve ajitasyon açısından farklılık anlamlı idi ($p<0,05$).

Tablo 5.5. Grup1 ve grup2 hastaların ve kontrol grubunun birinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerin karşılaştırılması.

n	Grup1 64	Grup2 36	Kontrol 74	P değeri
IFN-α (min-max)	192,26 (3,45-816,88)	71,38 (2,30-606,76)	5,90 (1,12-305,00)	0,001
IFN-β (min-max)	502,50 (10,60-1534,50)	463,450 (23,10-1659,50)	24,19 (2,38-477,00)	0,001
Viral yük (min-max)	84455,00 (168,80-185200000,00)	32250,00 (21,09-647800,00)		0,371

Hastalardan hastaneye ilk başvuru anında alınan birinci kan örneklerinde ve kontrol grubundaki kişilerde IFN-α, IFN-β ve viral yükün ortalama değerlerini araştırıp karşılaştırdık (Tablo5.5.). Tespit edilen ortalama IFN-α değerleri grup1'de 192,26 (3,45-816,88) pg/ml, grup2'de 71,38 (2,30-606,76) pg/ml ve kontrol grubunda ise 5,90 (1,12-305,00) pg/ml olarak tespit edilmiştir. Tüm KKKA hastalarında tespit edilen ortalama IFN-α değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek idi ($p<0,05$). Grup1'deki IFN-α değerleri hem grup2'deki vakalarda hemde kontrol grubunda bulunan kişilerde tespit edilen IFN-α değerleri ile karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Yine grup2'deki olgularda tespit edilen IFN-α değerleri kontrol grubundaki kişilerin ortalama IFN-α değerleri ile karşılaştırıldığında da farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Yine aynı gruplarda ilk başvuru anında alınan birinci kan örneklerinde bakılan IFN-β'nın ortalama değerleri ağır grupta 502,50 (10,60-1534,50) pg/ml, hafif grupta 463,450 (23,10-1659,50) pg/ml ve kontrol grubunda ise 24,19 (2,38-477,00) pg/ml düzeylerinde tespit edilmiştir. Hastalarda tespit edilen ortalama değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı idi($p<0,05$). Grup1'deki ortalama IFN-β değerleri ile kontrol grubunda bulunan kişilerde tespit edilen IFN-β değerleri karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Aynı şekilde grup2'deki ortalama IFN-β değerleri ile kontrol grubundaki kişilerde tespit edilen

ortalama IFN-β değerleri karşılaştırıldığında da farklılık istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05). Ancak grup1 ve grup2'de bulunan olgulardaki IFN-β değerleri karşılaştırıldığında ise farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi (p>0,05). Grup1 ve grup2'deki olgularda tespit edilen viral yük değerleri sırasıyla 84455,00 (168,80-185200000,00) kopya/ml ve32250,00 (21,09-647800,00) kopya/ml olarak tespit edilmiştir. Grup1 ve grup2'deki hastaların viral yükleri arasındaki ortalama fark ise istatistiksel olarak önemsiz idi (p>0,05).

Tablo 5.6. Grup1a, gru1b ve grup2 hastaların ve kontrol grubunun birinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerin karşılaştırılması.

	Grup1a 25	Grup1b 39	Grup2 36	Kontrol 74	P
IFN-α (min-max)	526,16 (3,45- 816,88)	154,85 (16,69-816,88)	71,38 (2,30-606,76)	5,90 (1,12-305,00)	0,001
IFN-β (min-max)	780,70 (29,40-1528,30)	397,90 (10,60-1534,50)	463,45 (23,10-1659,50)	24,19 (2,38-477,00)	0,001
Viral yük (min-max)	348800,000 (14450,00- 185200000,00)	34880,000 (168,80- 1545000,00)	32250,00 (21,09- 647800,00)		0,001

Hastaların takibi sırasında ölen hastalar dikkate alındığında hastaneye ilk başvuru anında alınan birinci kan örneklerindeki IFN-α'nın ortalama değerleri grup1a'da 526,16 (3,45- 816,88) pg/ml, grub1b'de 154,85 (16,69-816,88) pg/ml, grup2'de 71,38 (2,30-606,76) pg/ml ve kontrol grubunda ise 5,90 (1,12-305,00) pg/ml düzeylerinde idi. Grup1a'daki olgularda tespit edilen IFN-α değerleri hem grup1b'deki olgularla hem grup2'deki olgularla hemde kontrol grubundaki kişilerle karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05). Aynı şekilde grup1b'deki olgular ile kontrol grubunda bulunan kişilerdeki değerler karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05). Yine grup2'deki olgular ile kontrol grubundaki kişilerde elde edilen değerler karşılaştırıldığında da elde edilen farklılık da istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05).Ancak grup1b'deki olgular ile grup2'de bulunan olgularda elde edilen IFN-α değerleri karşılaştırıldığında elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi (p>0,05). Aynı hasta ve kontrol gruplarındaki IFN-β için ortalama değerler grub1a'da 780,70 (29,40-1528,30) pg/ml, grub1b'de 397,90 (10,60-1534,50) pg/ml, grup2'deki olgularda 463,45 (23,10-1659,50) pg/ml

ve kontrol grubunda ise 24,19 (2,38-477,00) pg/ml düzeylerinde idi. Grup1a'daki olgularda tespit edilen IFN-β değerleri ile hem grup1b'deki olgularla hem grup2'deki olgularla hemde kontrol grubundaki kişilerle karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Aynı şekilde grup1b'deki olgular ile kontrol grubunda bulunan kişilerdeki değerler karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($P<0,05$). Yine grup2'deki olgular ile kontrol grubundaki kişilerde elde edilen değerler karşılaştırıldığında elde edilen farklılık da istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Ancak grup1b'deki olgular ile grup2'deki olgularda elde edilen değerler karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). (Tablo 5.6.). Grup1a, grup1b ve grup2'deki ortalama viral yük düzeylerine bakıldığında grup1a'daki olgularda 348800,000 (14450,00-185200000,00) kopya/ml iken, grup1b'deki olgularda 34880,000 (168,80-1545000,00) kopya/ml ve grup2'deki olgularda ise 32250,00 (21,09-647800,00) kopya/ml düzeylerinde idi. Gruplara ait hastaneye ilk başvuru anında alınan örneklerdeki viral yük değerleri karşılaştırıldığında grup1a ile grup1b ve grup1a ile grup2 arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$), grup1b ile grup'2de yer alanlar arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo5.6.).

Tablo 5.7. Grup1a, grup1b ve grup2 hastaların ikinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve yükleri karşılaştırılması.

	Grup1a 25	Grup1b 39	Grup2 36	P değeri
IFN-α (min-max)	Yok	45,47 (5,17-177,88)	21,00 (5,17-816,88)	0,098
IFN-β (min-max)	Yok	1041,20 (10,60-1659,50)	525,90 (10,60-1515,80)	0,030
Viral yük (min-max)	Yok	167500,00 (3773,00- 224900000,00	16140,00 (330,80-436700,00)	0,001

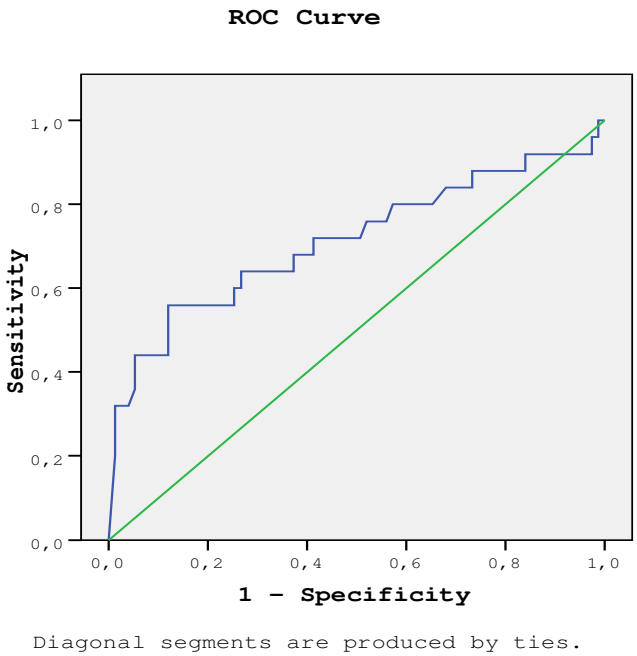
Çalışmaya alınan hastalardan 5. günde alınan ikinci kan örneklerinden de benzer şekilde IFN-α, IFN-β ve viral yük değerlerine bakılmıştır. Ancak takip sırasında ölen hastaların ikinci kan örnekleri elde edilemediğinden sadece yaşayan hastaların ikinci kan örnekleri değerlendirmeye alınmıştır. Alınan ikinci kan örneklerde belirlenen ortalama IFN-α, IFN-β ve viral yük değerleri Tablo 5.7'de verilmiştir. Gruplara ait ikinci örneklerdeki IFN-α değerleri karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>

0,05), grup1b ve grup2'deki olgularda tespit edilen ortalama IFN-β değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05). Yine aynı gruplara ait olgulardan alınan ikinci serum örneklerdeki viral yük değerleri karşılaştırıldığında grup1b ve grup2'deki olgular arasındaki farlılık da önemli bulunmuştur (p<0,05).

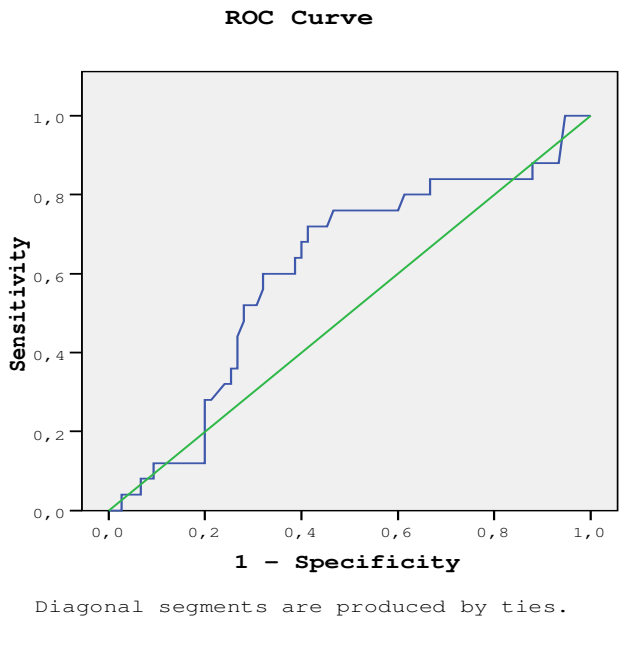
Tablo 5.8. Grup1b ve grup2 hastaların birinci-ikinci kan örneklerine ait interferon-α/β ve viral yüklerinin karşılaştırılması.

	Grup1b 39		P değeri	Grup2 36		P değeri
	1.	2.		1.	2.	
IFN-α (min-max)	154,85 (16,69-816,88)	45,47 (5,17-177,88)	0,001	71,38 (2,30-606,76)	21,00 (5,17-816,88)	0,033
IFN-β (min-max)	397,90 (10,60-1534,50)	1041,20 (10,60-1659,50)	0,002	463,45 (23,10-1659,50)	525,90 (10,60-1515,80)	0,850
Viral yük (min-max)	34880,000 (168,80-1545000,00)	167500,00 (3773,00-224900000,00	0,001	32250,00 (21,09-647800,00)	16140,00 (330,80-436700,00)	0,802

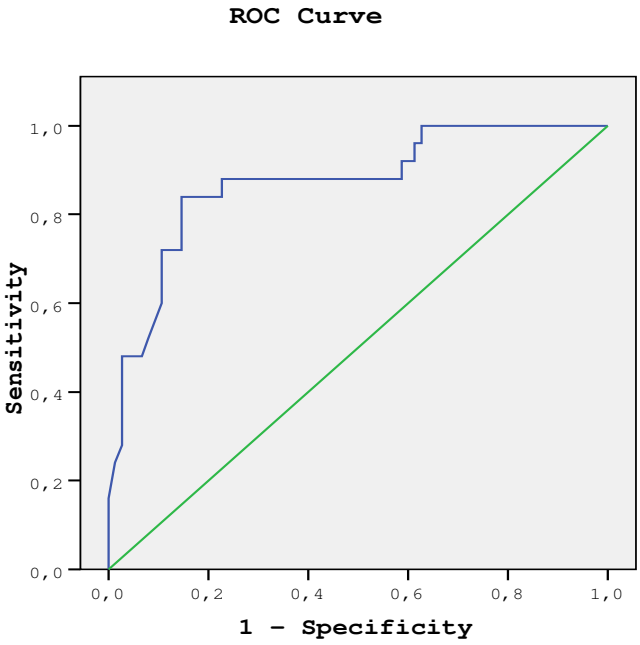
Çalışmaya alınan hastalardan ağır grupta bulunan ve ölen hastaların ikinci örnekleri elde edilmediğinden sadece grup1b ve grup'deki hastalara ait birinci ve ikinci kan örneklerinden elde edilen veriler birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 5.8.). Grup1b'de yer alan hastalardan elde edilen birinci serum örnekleri ve ikinci serum örneklerinden elde edilen ortalama değerler karşılaştırıldığında IFN-α için, IFN-β için ve viral yük için saptanan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulumuştur (p< 0,05). Aynı şekilde grup2'deki olgularda yapılan ölçümlerde elde edilen IFN-α değerleri arasındaki farlılık da önemli olarak bulunurken (p<0,05), IFN-β değerleri arasındaki farklılık ve viral yük ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0,05).



Şekil 5.1. İnterferon-α ROC analizini gösteren şekil.



Şekil 5.2. İnterferon-β ROC analizini gösteren şekil.



Şekil 5.3. Viral yük ROC analizini gösteren şekil.

Tablo 5.9. Ölen hastaların birinci kan örneklerinin ROC analizinin karşılaştırılması.

	Kesme noktası	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	EAKA*	Güvenilirlik Aralığı %95		P değeri
					Alt sınır	Üst sınır	
IFN-α	250,42	64,0	26,7	0,713	0,579	0,847	0,001
IFN-β	475,95	72,0	42,7	0,607	0,479	0,735	0,110
Viral Yük	84455,00	88,0	22,7	0,870	0,787	0,954	0,000

*EAKA: Eğri altında kalan alan

Ölen hastalardan alınan serum örneklerinden elde edilen IFN-α, IFN-β ve viral yük değerleri ROC analizi ile değerlendirildi. Yapılan ROC analizi sonucunda IFN-α için elde edilen kesim noktası 250,42 pg/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen grafikteki (Şekil 5.1) eğri altında kalan alanın büyüklüğü 0.713 idi, bu değer istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$) ve görüldüğü gibi %95 güvenilirlik aralığı 0.50'yi içermemektedir. IFN-α'nın

sensitivitesi %64, spesifitesi ise %26.7 idi. Buna göre IFN-α'nın hasta olan bireyleri belirleme oranı yüksek iken, sağlıklı bireyleri belirleme oranı düşük idi. IFN-β için belirlenen kesme noktası 475,95 pg/ml olarak bulundu. Elde edilen grafikteki (Şekil 5.2) eğri altında kalan alanın büyüklüğü 0.607 idi, bu değer istatistiksel olarak önemli değildi ($p>0,05$) ve görüldüğü gibi %95 güvenilirlik aralığı 0.50'yi içermektedir. Bu nedenle IFN-β için spesifite ve sensitiviteden bahsedilemez. Viral yük için elde edilen kesim noktası 84455,00 kopya/ml olarak bulundu. Elde edilen grafikteki (Şekil 5.3) eğri altında kalan alanın büyüklüğü 0.870 idi, bu değer istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$) ve görüldüğü gibi %95 güvenilirlik aralığı 0.50'yi içermemektedir. Viral yükün sensitivitesi %88, spesifitesi ise %22.7 idi. Buna göre viral yükün hasta olan bireyleri belirleme oranı yüksek iken, sağlıklı bireyleri belirleme oranı düşük idi. IFN-α, IFN-β ve viral yük ile ilgili veriler Tablo 5.9'da özetlenmiştir.

6. TARTIŞMA

VKA'lar, hastalarda yüksek ölüm oranları ile seyreden akut enfeksiyon hastalıklarıdır. Önemli VKA etkenleri Ebola ve Marburg virüsler, Lassa virüs, KKKA virüsü, Rift vadisi ateşi virüsü, Dengue virüsü ve Sarı Humma virüsüdür. KKKA, Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs cinsinde yer alan ve CCHFV ile oluşan, ateş ve kanama ile seyreden, şiddetli hastalığı olanlarda ek olarak şok ve önemli oranda mortal seyreden bir VKA'dir (6, 33,70). KKKA olguları ülkemizde ilk kez 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında Tokat, Sivas, Amasya, Yozgat, Bayburt, Erzurum, Erzincan ve çevresi olmak üzere İç ve Doğu Anadolu bölgelerinin kuzeyi ile Karadeniz bölgesinin güneyini kapsayan geniş bir alanda salgın görülmüş ve bundan sonraki yıllarda da sayı giderek artmıştır. ilk kez 2003 yılında hastalığın varlığı kanıtlanmıştır (16,68,115). Daha sonraki yıllarda ülkemizin birçok ilinden hastalık bildirimleri olmuştur (68).

KKKA hastalarında mortalite oranı farklı yayınlarda çok değişik rakamlarla ifade edilmektedir. Ölüm oranları %8-80 arasında değişmektedir (23). Bizim bölgemizdeki hastalarda Bakır ve arkadaşları (70)'nın 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada mortalite oranı %12 olarak tesbit edilmiştir. KKKA hastalığında ölümler genellikle hastalığın ikinci haftasında olmaktadır. Bu dönemde trombositopeni en derin seviyelerine ulaşmakta, ALT ve AST pik yapmakta, YDP ve kanamalar en çok bu dönemde görülmektedir. Yaşayan olgularda hastalığın 10. gününden itibaren hastalıgın 7-8'nci günlerinde kan seviyesi yükselmeye başlayan nötralizan antikorların virusu nötralize etmesiyle kan trombosit sayıları hızla yükselmekte, transaminazlar düşmekte, hastalık belirtileri düzelmekte ve hasta hızla iyileşmektedir. KKKA'nın özgül antiviral tedavisi hakkında özellikle son yıllarda artan sayıda klinik çalışmalar olmasına rağmen günümüzde halâ hastalığın etkin ve özgül bir antiviral tedavisi yoktur. Diğer çoğu VKA'larda olduğu gibi KKKA'da da ana tedavi yöntemi destek tedavisidir (4).

Virüsler, oldukça küçük ve hücre içine yerleşim gösteren mikroorganizmalardır. Bunlar hücre içinde çoğaldıktan sonra vücuda yayılırlar ve faklı dokulara yerleşirler. Viral kanamalı ateşe sebep olan ajanlar, sistemik olarak seyreden ve genellikle ölümcül hastalık oluşturan virüslerdir. İmmün sistem ise virüsleri değişik fazlarda engelleyerek yaşam siklüslerini bozar. Virüsler organizmaya girdikten sonra hümoral ve hücresel olmak üzere iki türde immün yanıtı uyarırlar. Bu yolla virüslere karşı oluşan IgM ve IgG türü antikorlar viremi sonucu gelişen viral infeksiyonları kontrol ederken, IgA sınıfındaki antikorlar da mukozadaki viral enfeksiyonları sınırlar (58). Kırım-Kongo kanamalı ateşi patogenezi hakkında önemli

ilerlemeler olmasına rağmen hala veriler yetersizdir (87). Bu konuda en fazla ilerleme Ebola virüsünün biyolojisinin anlaşılmasında sağlanmıştır. Bu bilgi bize Lassa, Marburg, Sarı Humma, Kırım-Kongo kanamalı ateş, Rift Vadisi ateşi virüslerini içeren diğer viral kanamalı ateş ajanlarının anlaşılmasında öncülük etmiştir. VKA'ların ortak özelliği antiviral yanıtı başlatan hücrelere saldırması ve bunun sonucunda konağın immün yanıtının bozulmasıdır (73,74,93,114).

KKKA patogenezinde endotel enfeksiyonu önemli bir role sahiptir (76). Yapılan çalışmalarda bu KKKA virüslerinin dendritik hücreler, monositler, makrofajlar, endotel hücreleri, hepatosit ve adrenal korteks hücreleri gibi birçok hücre tipini enfekte ettiğini göstermektedir (76,83). Virüs reseptöre bağlanarak girdikten sonra ilgili hücrelerin stoplazmalarında çoğalmaya başlar. KKKA virüsünün hücresel reseptörü henüz kesin olarak bilinmemektedir (6). Monositlerin uyarılması sonucunda IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi sitokinlerin salgılanması aktive olur. Daha önce KKKA nedeniyle ölen hastalarda proinflamatuar sitokinlerin, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-12 (IL-12) ve tümör nekrozis faktör-α (TNF-α) gibi sitokinler araştırılmış ve yaşayan hastalara göre bu sitokinlerde anlamlı oranda yükseklik olduğu bildirilmiştir (30, 82). Yapılan bu çalışmada IL-1, IL-6, IL- 10, IL-12 ve TNF-α yüksekliği tespit edilen hastaların kliniğinin daha şiddetli olduğu ve bu kişilerde oluşan YDP bozukluğu, kanama ve şok varlığından dolayı hastalığın hızlı seyrettiği görülmektedir (30). Hem virüsün endotel hücrelerini direkt olarak hedef alması hem de salgılanan sitokinlerin endotel üzerinde oluşturduğu etki sonucunda bilinen vasküler hasar gelişir (82).

VKA'larda diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi bağışıklık sistemi hastalığın iyileşmesinde önemli rol oynar. Özellikle ağır vakalarda bozulmuş olan bağışık yanıt sözkonusudur (76). Ebola virüslerinin oluşturduğu VKA'da yapılan bir çalışmada hastalığın ikinci haftasına kadar virüse özgül antikor yanıtı oluşturmayan hastaların öldüğü bildirilmiştir (77,78). Yapılan çalışmalarda KKKA nedeniyle ölen hastalarda da antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmektedir (79,80). Viral enfeksiyonlara karşı savaşta IFN'lar önemli bir yere sahiptir. Ağır hastalarda infeksiyonun seyri sırasında yeterli interferon artışı sağlanamazsa, konakta virüs replikasyonu engellenemeyebilir (85). KKKA'nın seyri sırasında etken virüs Tip I IFN'ler tarafından güçlü bir şekilde baskılansa bile virüs insanda yaptığı yıkıma devam eder. Bu, ya virüsün uyardığı interferonların tedavi edici etkisinden ziyade koruyucu bir etkisinin olması yada infekte hücreler tarafından IFN yapımının yetersiz olması ile açıklanabilir (92).

Bu çalışmada yöremizde endemik olarak görülen, ağır seyredebilen ve bazı olgularda da ölümle sonuçlanabilen KKKA'lı hastaların serum örneklerinde IFN-α, IFN-β ve viral yük seviyelerini belirlemeyi, bu IFN değerlerinin viral yük, hastalığın şiddeti ve mortalite ile ilişkisinin olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. KKKA olgularının hafif ya da ağır seyretmelerinin nedenleri kesin olarak bilinmemekle birlikte genetik farklılıklar, viral yük, virüsün alınış yolu ve altta yatan hastalıklar gibi değişik faktörler ileri sürülmüştür (31,34). Çalışmaya alınan KKKA hastalarının ağır ya da hafif grup olup olmadığı daha önce belirtildiği gibi Swanepoel ciddiyet kriterlerine göre belirlenmiştir (33). Buna göre çalışmaya dahil edilen hastaların 64 (% 64)'ü ağır grupta (grup1), 36 (%36)'sı ise hafif grupta (grup2) yer almakta idi. Grup1'de yer alan 64 hastanın 24 (% 37.5)'ü kadın, 40 (62.5)'ı ise erkek olgulardan oluşurken, grup2'deki hastaların 18 (% 50)'i kadın, 18(% 50)'i ise erkek olgulardan oluşmakta idi. Grup1'deki hastaların yaşları 17 ile 80 (ortalama 51.43±16.77), grup2'deki hastaların yaşları ise 26 ile 72 (ortalama 49.52±12.23) arasında değişmekte idi. Kontrol grubu olarak seçilen 74 hastanın 38(%51.4)'i erkek, 36(%48.6)'sı ise kadın olgulardan oluşmakta idi. Kontrol grubunda yer alan 74 hastanın yaşları 21 ile 70 (ortalama 47.00±12.10) arasında değişmekte idi. Grup1, grup2 ve kontrol gruplarına dahil edilen vakalar arasındaki yaş ve cinsiyete göre farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$) (Tablo 5.1).

Daha önce ifade edildiği gibi KKKA hastalarında ağırlık kriterlerinin ilk kez 1989 yılında Swanepoel ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (33). Buna göre ağırlık kriterleri ilk 5 gün içinde kan lökosit sayısının 10.000'in üzerinde olması, trombosit sayısının 20.000 hücre/mm^3'ün altında olması, serum AST >200 IU/L, ALT>150 IU/L olması, aPTT >60 saniye olması ve fibrinojen seviyesi ise <110 μg/dl olması şeklinde bildirmiştir. Çevik ve arkadaşları (124) yaptıkları çalışmada ölen olgularda ortalama trombosit sayısının yaşayan olgulara oranla anlamalı düzeyde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar ölen hastalarda yaşayanlara göre ortalama PT, aPTT, ALT, AST, LDH ve CPK değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu, INR düzeyinin ise daha uzun olduğunu bulmuşlardır. Ergönül ve ark. (112) yaptıkları çalışmada AST'nin 700 U/L, ALT'nin ise 900 U/L'nin üzerinde olmasının hastalığın şiddetini gösteren önemli birer kriter olduğunu ifade etmişlerdir. Yine ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise ağır KKKA hastalarında hafiflere göre PT, aPTT, GGT, INR, AST, ALT, LDH değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğu belirtilmiştir (16). Bir başka çalışmada ise KKKA hastalarının hemen hepsinde trombositopeni ve lökopeni görüldüğü, AST, ALT, LDH ve CPK seviyelerinin ise yükseldiği, PT ve aPTT'nin uzadığı, fibrin yıkımı nedeniyle fibrin düzeyinin düştüğü bildirilmiştir (140). Biz de yaptığımız çalışmada başvuru anında alınan serum örneklerinde grup1 ve grup2

olgularda bazı laboratuar değerlerini karşılaştırdık (Tablo 5.1.). Grup1'de yer alan olgularda tespit edilen ortalama ALT, AST, LDH, ve D-dimer düzeylerinin grup2'deki olgulara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu, trombosit ve fibrinojen düzeylerinin ise düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Görüldüğü gibi bizim çalışmamızda da bulunan ortalama değerler önceden yapılan çalışmalarda bulunan değerlerle uyumlu idi. Bazı çalışmalarda KKKA hastalarında görülen lökositozun mortalite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda lökositoz açısından grup1 ve grup2'de önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçun vaka sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, grup1 ve grup2'de başvuru anında alınan serum örneklerinde belirlenen ortalama INR ve PT değerleri karşılaştırıldığında fark önemsiz tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bizim çalışmamızda ağır ve hafif gruptaki olgularda tespit edilen ortalama INR ve PT değerlerinin anlamsız olması olgu sayısı ile ilişkili olabilir.

Geisberg ve ark (73)'nın Ebola virüsü ile yaptıkları çalışmada başta proinflamatuar sitokinlerin üretimi olmak üzere farklı mekanizmaların etkilenmesiyle YDP oluştuğunu belirtmişlerdir. İmmünohistokimyasal ve ultrastrüktürel yolla yapılan çalışmalarda Hantaan virüs ve KKKA ile infekte hastalarda endotel hücrelerinde virüs gösterilmiştir. Bu nedenle de KKKA patogenezinde de endotelin enfeksiyonunun önemli bir role sahip olabileceği ileri sürülmüşür (76). Endotel hasarı sonucunda yaygın damar içi pıhtılaşma bozukluğu oluşmaktadır. Elaldı ve ark.(87)'nın 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada YDP skorunun ölen hastalarda yaşayanlara oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda YDP skoru grup1'deki olgularda ortalama 3,46±1,06 iken, grup2'deki olgularda bu değer ortalama 2,11 ± 1,06 idi. Bizim çalışmamızda da başvuru anında alınan serum örneklerinde tespit edilen ortalama YDP skoru grup1'deki olgularda grup2'dekilere göre anlamlı olarak yüksek idi (Tablo5.1) ve literatür bilgisi ile paralellik göstermekte idi.

KKKA hastalarının bulgu ve belirtileri ile ilgili ölen ve yaşayan olguları karşılaştıran birçok araştırma bulunmaktadır. Çevik ve ark (124) yaptıkları çalışmada ölen ve yaşayan olguları karşılaştırmışlar ve ölen olgularda ekimoz, hematemez, melena, somnolans ve dişeti kanamalarının anlamlı olarak daha yüksek oranda görüldüğünü belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise KKKA olgularda melena ve somnolansın varlığının ölümle bağlantılı bağımsız risk faktörleri olduğu belirtilmiştir (124). Ülkemizde Hatipoğlu ve ark. (126)'nın yaptıkları çalışmada ise kanama, diyare, konfüzyonun ölen vakalarda yaşayan vakalara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Özkürk ve ark (127) ise çalışmalarında boyun ağrısı, konfüzyon, kanama, peteşi/ekimoz varlığının ölen vaklarda daha yüksek olduğunu belirtilmiştir (127).

Bizde çalışmamıza aldığımız hastaları somnolans, ajitasyon, kanama ve organ yetmezliği açısından karşılaştırdık (Tablo5.2.). Bizim yaptığımız çalışmada da başvuru anında çalışmaya alınan grup1 ve grup2 arasında somnolans, ajitasyon ve organ yetmezliği açısından istatistiksel fark önemsiz olarak bulunurken ($p>0,05$), kanama açısından gruplar arasındaki farklılık önemli olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Görüldüğü gibi bizim çalışmamızda da diğer çalışmalarla uyumlu bir şekilde, kanama görülmesi açısından gruplar arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur.

Çalışmamıza alınan hastaların takip ve tedavi süreleri içinde grup1'de bulunan toplam 64 olgunun 25 (%39)'i kaybedilmiştir. Ölen hastaların yaş ortalaması 56,68 ± 15,59 idi ve bunların 10 (% 40)'u kadın ve 15 (%60)'i erkekti. Daha sonra olguların başvuru anındaki laboratuar parametreleri, bulgu ve belirtileri grup1a, grup1b ve grup2 şeklinde ayrılarak karşılaştırılmıştır. Bu üç gruptaki olgularda tespit edilen ortalama laboratuar değerleri Tablo5.3.'te verilmiştir. Çevik ve ark (124) ülkemizde ölen olgularla yaşayan olguları karşılaştırdıkları araştırmalarında ekimoz, hematemez, somnolans gingival kanamanın fatal olgularda non fatal olgulara oranla daha fazla görüldüğünü belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar ortalama ALT, AST, LDH, PT, aPTT, CPK ve INR değerlerinin ölen olgularda yaşayanlara göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bakır ve ark (70) yaptıkları çalışmada ölen olgularda AST, ALT, LDH, INR ve CPK değerlerinin yaşayanlara göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. PT, aPTT, INR seviyelerinin yüksekliği, trombosit sayısı ile fibrinojen sviyesinin düşüklüğü KKKA hastalarında ölüm ile ilişkili prognostik faktörler olarak belirtmişlerdir (125). Bakır ve ark(140)'ı yaptıkları bir başka çalışmada ortalama AST 200 U/L, ALT 50 U/L, LDH 750 U/L ve lökosit sayısını mm3'te 10.000 olarak bulmuşlardır (140). Yine ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ağır oluguları belirlemek için laboratuar parametrelerinin seviyelerinin kesim noktalarını belirlemişlerdir. Buna göre kesim değerleri trombosit için 90000/mm^3, Hb için 13,5 g/dl, PT için 13.1 saniye, aPTT için 34 saniye, INR için 1.0, AST için 117 IU/l, ALT için 7 IU/l, AST/ALT oranı için 1.62, LDH için 508 IU/l, CK için 267 IU/l şeklinde tespit edilmiştir (141). Çalışmamızda üç grupla ilgili tespit edilen ortalama laboratuar değerlerine bakıldığında grup1a'daki ortalama ALT, AST, LDH, trombosit, fibrinojen, D-dimer, lökosit sayısı ve YDP skoru ile grup1b ve grup2'deki olgularda tespit edilen ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Yine grup1b'deki olgularda tespit edilen ortalama değerler ile grup2'deki olgularda tespit edilen ortalama değerler karşılaştırıldığında da oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Ancak PT ve INR değeri açısından bakıldığında hem grup1a'daki hastalar ile grup1b ve grup2'deki olgular karşılaştırıldığında hemde grup1b'deki olgular ile

grup2'deki olgular karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulundu (p>0,05) (Tablo5.3.). Görüldüğü gibi literatür ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda yer alan olgulardaki ortalama laboratuar parametreleri hem grup1a'da ve hemde grup1b'deki olguları grup2'deki olgularla karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar tüm vakaların yaklaşık %75'inde hastalığın 3 ilâ 7 nci günlerinde tipik kanama bulgularının ortaya çıktığını göstermiştir; burun, diş etleri, gastrointestinal sistem, akciğerler ve genitoüriner sistem kanamaları görülebilir. Ayrıca bu hastalarda, huzursuzluk hissi, kişilik bozuklukları olabilir ve bu durum vakaların %10-25'inde ajitasyon veya depresyon, koma gibi giderek ciddileşen santral sinir sistemi bulgularına dönüşebilir özellikle bu vakalarda prognoz kötüdür ve bu olgularda görülen ölüm oranları %8-80'lere varabilmektedir (81, 96). Ergönül ve ark. (112)'ı yaptıkları çalışmada KKKA hastalarındaki AST/ALT oranı yüksekliğinin mortaliteyi gösteren bağımsız bir faktör olduğunu ifade etmişlerdir. Hatipğolu ve ark(126) yaptıkları çalışmada ölümlü hastalarda görülen kanama, diyare ve konfüzyon gibi belirtilerin yaşayan olgulara oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ALT, AST, LDH, alkalen fosfataz ve CRP'nin ölen olgularda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada diyare, melena, hematemez, hematüri, ALT ve AST yüksekliği ve aPTT'nin uzamasının fatalite ile ilişkili klinik ve laboratuar parametreleri olarak ileri sürmüşlerdir. Yine önceden yapılan çalışmalarda sık ölüm sebebleri arasında organ yetmezliklerine de (kardiyak, serebral, karaciğer, böbrek, pulmoner) işaret edilmiştir (31,34). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ölen hastalardaki boyun ağrısı, konfüzyon, koma ve peteşi/ekimoz oranlarının yaşayan hastalara oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (127). Aynı çalışmada araştırmacılar ek olarak ortalama ALT, AST, LDH, CK, PTT, ve INR'nin ölenlerde daha yüksek, ortalama PLT değerlerinin ise daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bizde grup1a, grup1b ve grup2'deki hastalarda görülen somnolans, ajitasyon, kanama ve organ yetmezliği gibi semptomları karşılaştırdık (Tablo 5.4.). Bizim çalışmamızda kanama açısından bakıldığında grup1a'daki olgular ile grup1b ve grup2'deki olgular arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05), yine grup1b ve grup2 kanama açısından karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli idi (p<0,05). Bu bulgunun literatür bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki olgularda tespit edilen somnolans ve ajitasyon açısından baktığımızda ise hem grup1a ile grup1b ve grup2 arasında hemde grup1bile grup2 arasında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi (p<0,05). Ayrıca, çalışmamızda bazı hastalarda organ yetmezliği görülmüştür. Hastalardaki organ yetmezliği açısından grup1a'daki olgularla grup1b ve grup2'deki olgular arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunmuştur (p<0,05). Aynı şekilde grup1b ve grup2'deki olgular

arasındaki farklılıkta önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Baktığımızda bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz bulgu ve belirtiler literatürdeki çalışmalarla benzer şekilde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Genelde VKA özelde KKKA hastalarında yapılan çalışmalarda ağır seyreden ve ölümle sonuçlanan vakalarda viral replikasyonun fazla olduğu ve buna bağlı olarak viral yük düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada viral yük ile fatalite arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (102). Araştırmacılar bu çalışmada hastalığı hafif geçiren vakalarda viral yük seviyelerinin düşük ve ağır seyredenlerde ise yüksek olduğunu belirtmişlerdir. KKKA en önemli basamak olan endotel enfeksiyonu, direkt olarak endotel enfeksiyonu şeklinde yada dolaylı olarak virüsün yönlendirdiği konak kökenli etmenlerin endotel aktivasyonuna ve disfonksiyonuna yol açması ile oluşur (73,83). KKKA ile ilgili yapılan sınırlı çalışmalardan birinde KKKA hastalarındaki IL-10 cevabının geciktiği ya da downregüle edilmesine bağlı olarak CCHFV'in replikasyonunun arttığı ve buna bağlı olarakta hastalığın şiddetlendiği, bunun sonucunda IFN- γ ve TNF- α üretiminin artığı ileri sürülmüştür (127). Üretimi artan bu sitokinlerde vasküler disfonksiyona yol açar. Aynı çalışmada ölen hastalarda viral yük seviyesi yaşayanlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca ölen hastalardaki antikor yanıtı yaşayan olgulara oranla daha zayıf olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada KKKA hastalarında elde edilen bu sonuçlar Ebola virüsü, Lassa virüsü ve Sarı Humma virüsünden elde edilen sonuçlarla korele olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada viral yük seviyesinin >1E+08'in üzerinde olmasının ölen ve yaşayan hastalar arasında önemli bir ayırıcı faktör olduğu ileri sürülmüştür. Towner ve ark (128)'ı da Ebola virüsü ile enfekte hastalarda yaptıkları çalışmada viral yük seviyelerinin ölen hastalarda yaşayanlara oranla daha yüksek olduğunu belirterek bu hastalardaki viral yük seviyelerinin yüksek olmasının ölüm için belirleyici bir faktör olduğunu ileri sürerek benzer sonuçlara işaret etmektedirler. Yapılan bir başka çalışmada ise çeşitli VKA olgularında viral yük konsantrasyonları yaşayan olgulara oranla daha yüksek bulunmuştur; örneğin bu çalışmada Lassa ateşi geçiren bir hastada 4. günde 7E+06 ve 13. günde 4E+09 kopya/ml olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada Ebola virüs enfeksiyonunda akut dönemde 6.9E+08 kopya/ml ve konvelesan dönemde 7E+ 06 kopya/ml olarak bulunurken KKKA'te 7.7E+05 kopya/ml, yellow fever virüsünde 4E+05 kopya/ml ve deng ateşinde 8E+05 kopya/ml olarak bulunmuştur (2). Bir diğer çalışmada ise ölen KKKA olgularında ortalama viral yük seviyeleri 28,99E+06 kopya/ml ile 14E+06 kopya/ml olarak bulunmuştur (121). Hastanemizde 2006 yılında yapılan bir çalışmada KKKA nedeniyle ölen hastaların hastaneye başvuru gününde serum virüs titrelerinin yaşayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu

(5.5E+09 kopya/ml'ye karşı 5.7E+08 kopya/ml), ardışık ölçümlerde ise ölenlerde ölüm gününe kadar yüksek seyrettiği bildirilmektedir (87). Bizde yaptığımız çalışmada başlangıçta çalışmaya aldığımız grup1 ve grup2'deki olgularda ortalama viral yük seviyelerini belirledik ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırdık (Tablo 5.6.). Bizim yaptığımız çalışmada başlangıçta alınan birinci serum örneklerindeki ortalama viral yük değerleri grup1 ile grup2'deki hastalar karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0.05$).

Takipleri sırasında ölen hastalar dikkate alınarak grup1a, gru1b ve grup2 arasındaki viral yük seviyelerini de karşılaştırdık (Tablo5.6). Viral yük seviyelerinin ortanca değeri grup1a'da 348800 kopya/ml, grup1b'de 34880 kopya/ml ve grup2de ise 32250 idi. Gruplara ait hastaneye ilk başvuru anında alınan örneklerdeki viral yük değerleri karşılaştırıldığında grup1a ile grup1b ve grup1a ile grup2 arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$), grup1b ile grup2'de yer alanlar arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Görüldüğü gibi bizim yaptığımız çalışmada tespit ettiğimiz viral yük seviyeleri ölen gruptaki hastalarda yaşayan gruplardaki hastalara oranla daha yüksek çıkmıştır. Bu durum literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmektedir. Buna göre KKKA hastalarında viral yükün yüksek düzeyde olmasının ölümle ilişkili olduğunu söyleyebiliriz yani KKKA'lı hastalarda kontrol edilemeyen viremi durumunda fatalite oranı yüksek olmaktadır diyebiliriz.

Biz yaptığımız çalışmada aldığımız ikinci serum örneklerinde tespit edilen ortalama viral yük seviyelerini de karşılaştırdık (Tablo 5.7). Alınan ikinci serum örneklerinde tespit edilen viral yükün ortanca değerleri grup1b'de 167500 kopya/ml ve grup2'de 16140 kopya/ml olarak tespit edildi. Grup1a'daki hastaların ikinci kan örnekleri temin edilemediğinden değerlendirilemedi. Buna göre grup1b'deki olgular ile grup2'deki olgularda tespit edilen ortalama viral yük seviyelerinde oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 5.7). Bu verilere baktığımızda KKKA hastalarında ilerleyen günlerde de viral yük seviyelerinin yüksek seyretmeye devam ettiğini söyleyebiliriz. Bu durum literatür ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu ve KKKA hastalarında viral replikasyonun devam ettiğine işaret etmektedir.

Çalışmaya aldığımız hastaların birinci ve ikinci kan örneklerinde tespit edilen viral yük seviyelerini de birbirleriyle karşılaştırdık (Tablo 5.8). Ağır grupta olupta ölen hastaların ikinci serum örnekleri temin edilemediğinden bunların değerlendirilmesi yapılamadı. Grup1b'de yer alan hastalardaki birinci serum örnekleri ve ikinci serum örneklerinden elde edilen ortalama viral yük seviyeleri karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,05$). Ancak grup2'deki olgularda birinci ve ikinci serum örneklerinde yapılan ölçümlerde

elde edilen viral yük ölçümleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

İnsanlardaki immün sistem doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve kazanılmış immün sistem olmak üzere iki bileşenden oluşur. Konağın bir patojen mikrorganizma ile karşılaşmasından sonraki kısa bir süre içerisinde doğuştan gelen bağışıklık sistemi aktif hale gelir ve enfeksiyonun ilk saatleri ve günlerinde konak savunmasını koordine eder (106). Ebola ile yapılan bir çalışmada ölen ve yaşayan hastaların serum sitokin seviyeleri kontrol grubundaki olgularla karşılaştırılmış ve IL-2, IL-10, TNF-α ve IFN-γ seviyeleri ölen olgularda belirgin bir şekilde yükselmiş olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar immün aktivasyonun yüksek derecede olduğunu ve Ebola kanamalı ateş hastalarında fatal sonuca katkıda bulunduğunu göstermektedir (120). Yapılan bir başka çalışmada ortalama IFN-γ değerleri 59,3 pg/ml olarak bulunmuş ve KKKA hastalarındaki viral yük seviyelerinin sadece hastalığın prognozuyla değil yaşayan hastalardaki hastalık şiddetiyle de korele olduğu ileri sürülmüştür (127). Yapılan çalışmalar virüslerin konakta oluşturduğu enfeksiyona karşı en etkin ve hızlı konak yanıtının tip I interferonlar (IFN- α/β) tarafından verildiğini göstermektedir (90,92). Bu IFN yanıtı doğuştan gelen antiviral bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır (92). Özellikle de tip I IFN (başlıca α ve β) bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve spesifik antiviral etkinlikte kritik bir işleve sahiptir ve enfeksiyonun erken aşamasında virüsün yayılmasının sınırlandırılmasında önemli bir rol oynar (90). Yine bu çalışmada KKKA virüsünün IFN'ın etkisinden kaçınmak için çeşitli kaçınma mekanizmaları geliştirdiği belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada virüsün konak hücrelerine yerleşmesi ile birlikte öncelikle IFN-β salınımının olduğu ve böylelikle viral enfeksiyonun durdurulmaya çalışıldığı sonrasında ise IFN-β üretiminin durduğu ve yerine IFN-α üretiminin artarak devreye girdiği ileri sürülmüştür (92). Diğer bir çalışmada genel olarak VKA'lerde Tip I IFN'ın önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (130). Bu çalışmada RVF'da gecikmiş immun yanıt ile artmış mortalite arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada akut kanamalı ateş sendromlarında ölen olgularda yaşayanlara oranla akut dönemde IFN-α seviyeleri yüksek olarak tespit edilmiştir, yine benzer şekilde maymunlarda yapılan deneysel Ebola virüs enfeksiyonlarında da IFN-α seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur. Bir başka çalışmada Lassa virüs enfeksiyonlarında tespit edilen IFN-α ve IFN-γ'nın virüs replikasyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir (131). KKKA ile ilgili olarak yapılan bir çalışmda CCHFV'nin IFN-α tarafından inhibe edildiğini ortaya koymuştur (132). Başka bir çalışmada ise Ebola virüsünün VP35 proteininin interferonlara antagonist etki yaptığını ortaya koymuştur (135). Aynı çalışmada VP35'in Tip I

IFN'un fosforilasyonunu inhibe ederek IFN'un regülatör faktör aktivasyonunu önlediğini ve muhemelen bu proteinin IFN-β'nın da transkripsiyonunu önlediği ileri sürülmüştür.

IFN'ların VKA'deki etkileriyle ilgili olarak literatüre baktığımızda KKKA ile ilgili çok az çalışma olduğu görülmektedir. Bu konudaki çalışmalar daha çok Ebola virüsü ile ilgili olarak yapılmıştır. Ayrıca daha az sayıda Marburg virüsü ve Lassa virüsü ile ilgili çalışmalarda vardır. Yapılan bir çalışmada hem Marburg virüsü hem de Ebola virüslerinde ortak özellik olarak IFN α/β salınımını inhibe edildiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada bu virüslerin farklı inhibisyon yolakları kullanarak savunma sistemlerinden kaçındıkları da tespit edilmiştir (134). Marburg virüsü ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada bu virüsün Lake Victoria marburgvirus Musoke (MARV) suşunda bulunan VP40 matrix proteininin primatların hücrelerindeki hücresel tirozin kinaz jak 1'in aktive olmasını engelleyerek IFN α/β ve IFN-γ'nın sinyal iletimini antagonize ettikleri belirtilmektedir (135). Aynı çalışma farklı bir Marburg virüsü suşu olan *Ravn* suşundaki VP40 (RAVV VP40*)* proteininin insanların hücrelerindeki IFN sinyal iletimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ebola virüsü ile enfekte olup yaşayan insanlar ve hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar göstermiştir ki enfeksiyonun erken döneminde iyi düzenlenmiş sitokin yanıtı enfeksiyonun gidişatında kritik öneme sahiptir (137). Bu çalışmada diğer birçok virüste olduğu gibi Filovirüslerininde Tip 1 IFN'un etkisinden kaçınmak için evrim geçirdikleri ve hem Marburg virüs hem de Ebola virüsünün hem IFN indüksiyonunu ve hem de IFN sinyal oluşumunu engelledikleri belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada Ebola virüsü ve Marburg virüsünün immüm sistemden kaçınmak için özelleşmiş mekanizmalara sahip olduğu bildirilmiştir (138). Bu çalışmada araştırmacılar Ebola virüsü ve Marburg virüslerinin dendritik hücreleri sitokinlerin salınımını uyarmadan enfekte ettikleri ve bu hücrelerde replike olduklarını belirtmişlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada başlangıçta alınan birinci serum örneklerinde hem IFN-α hemde IFN-β'nın ortalama değerlerini tespit ettik ve istatistiksel olarak karşılaştırdık (Tablo 5.5.). Grup1'deki IFN-α değerleri hem grup2'deki olgularda hemde kontrol grubunda bulunan kişilerde tespit edilen IFN-α değerleri ile karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p< 0,05$). Yine grup2'deki olgularda tespit edilen IFN-α değerleri kontrol grubundaki kişilerin ortalama IFN-α değerleri ile karşılaştırıldığında da farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p< 0,05$). Çalışmamızda ilk başvuru anında alınan serum örneklerinde IFN-β'nın ortalama değerlerini de karşılaştırdık. Grup1'deki ortalama IFN-β değerleri ile kontrol grubunda bulunan kişilerde tespit edilen IFN-β değerleri karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Aynı şekilde grup2'deki ortalama IFN-β değerleri ile

kontrol grubundaki kişilerde tespit edilen ortalama IFN-β değerleri karşılaştırıldığında da farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Ancak grup1 ve grup2'de bulunan olgulardaki IFN-β değerleri karşılaştırıldığında ise farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$). Görüldüğü gibi bizim yaptığımız çalışmada hem grup1 hemde grup2'deki olgularda tespit edilen hem IFN-α hemde IFN-β değerleri kontrol grubundaki kişilerin ortalama değerlerinden oldukça yüksek bulunmuştur ve bu durum literatürde yapılan benzer çalışmalarda tespit edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu durum KKKA hastalarında aslında yüksek düzeyde IFN-α ve IFN-β salgılandığını ancak hastalardaki viral replikasyonu engellemeye yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bu da KKKA virüsünün bir şekilde immün mekanizmalardan ve IFN'ın etkisinden korunduğunu düşündürmektedir.

İnterferon hastalığa karşı immün cevapda önemli rol oynar. Enfeksiyona cevapda gecikmiş IFN cevabı kontrol edilemeyen viremi ile sonuçlanır. Genellikle Tip 1 IFN cevabı viral kanamalı ateş patogenezinde önemli bir role sahip gibi görünmektedir. Viral kanamalı ateş hastalarında IFN α'nın dolaşımdaki seviyeleri tuhaf bir şekilde yüksektir ve akut faz sırasında ölümcül olgularda yaşayanlardan önemli ölçüde daha yüksektir. Ebola ile enfekte hastalarda dolaşımdaki IFN α seviyeleri arasında tutarsızlık vardır, ancak deneysel olarak enfekte edilen maymunlarda yüksek IFN α seviyeleri gözlenmiştir. Bir çalışmada Lassa virüslerinin IFN α' ya dirençli olduğu bulunurken daha yeni çalışmalarda IFN α ve IFN γ' nın viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Rift Vadisi ateşinde α interferonun üretimi vireminin kontrolünde, hastalığın sonlanmasında ve nötralizan antikorların gelişimine kadar önemli olduğuna dair kanıtlar vardır (76). Flavirüslerle ilgili yapılan bir çalışmada kene kaynaklı Flavirüs enfeksiyonlarının iyileşmesinde IFN cevabının kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir ancak sivrisinek kaynaklı Flavirüs enfeksiyonlarında bu IFN cevabının inhibe edilebildiği bildirilmiştir (136). Bu çalışmada kene kaynaklı bu kompleks virüslerin bir üyesi olan Langat virüsünün IFN'un antiviral etkisine karşı duyarlı olduğu ancak bu virüsün IFN α/β ve IFN-γ'ya duyarlı promoterler tarafından yürütülen IFN ile indüklenen haberci genlerin expresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu vriüslerde bulunan NS5 proteininin tek başına IFN cevabındaki STAT1 fosforilasynunu engeleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir ve bu protein potansiyel bir IFN antagonisti olarak tanımlanmıştır. KKKA ile ilgili yapılan bir çalışmada STAT 1'den yoksun farelerin KKKA enfeksiyonuna yüksek düzeyde duyarlı oldukları ve bu farelerin enfeksiyonu aldıktan sonra 3-5 gün içinde öldüğü bildirilmiştir (139). Bu çalışmada yapılan immünolojik analizler KKKA hastalarında virüsün replikasyonunun kontrol altına alınmasında IFN'ların önemli bir yere sahip olduğunu

göstermiştir. KKKA ile ilgili yapılan bir başka çalışmada Tip 1 IFN reseptörlerinden yoksun bırakılan (IFNAR -/-) yetişkin farelerin CCHFV'ne duyarlı olduğu ve virüsün bu farelerde ölümcül hastalık geliştirdiği bildirilmiştir. Aksine Wild-type KKKA enfeksiyonunun asemptomatik seyrettiği görülmüştür. Enfekte olan bu iki tip farenin tüm organlarında viral RNA tespit edilmiş ancak IFNAR -/- farelerin iç organlarında tespit edilen viral RNA miktarı daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Bu durum IFN'un virüs yayılımını sınırladığını ortaya koymaktadır. Yine çalışmamızda takibi sırasında ölen hastalar dikkate alınarak oluşturulan üç gruptaki olgularda tespit edilen IFN-α ve IFN-β değerlerini karşılaştırdık(Tablo 5.6.). Burada da görüldüğü gibi grup1a'daki olgularda tespit edilen IFN-α değerleri ile grup1b, grup2 ve kontrol grubundaki olgularda tespit edilen IFN-α değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Grup1b'deki olgulara ait IFN-α değerleri ile kontrol grubundaki kişilere ait IFN-α değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık önemli idi ($p<0,05$). Grup2'deki olgular ile kontrol grubundaki kişilere ait IFN-α değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel fark önemli idi ($p<0,05$). Ancak grup1b ve grup2'de bulunan olgulara ait IFN-α değerleri karşılaştırıldığında elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$). Aynı hasta ve kontrol gruplarındaki olgularda ortalama IFN-β değerlerini de karşılaştırdık. Grup1a'daki olgularda tespit edilen IFN-β değerleri ile grup1b, grup2 ve kontrol grubundaki olgulara ait IFN-β değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Grup1b'deki olgular ile kontrol grubunda bulunan kişilere ait IFN-β değerleri karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Grup2'deki olgular ile kontrol grubundaki kişilere ait IFN-β değerleri karşılaştırıldığında elde edilen fark istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$). Ancak grup1b'deki olgular ile grup2'deki olgulara ait IFN-β değerleri karşılaştırıldığında oluşan fark ise istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$). (Tablo 5.6). Tablo 5.5. ve Tablo 5.6. daki viral yük ve IFN α/β değerleri incelendiğinde bizim incelediğimiz vakalarda aynı gün alınan serum örneklerindeki IFN α ve viral yük değerlerinin yüksek olduğu ve tespit edilen değerlerin her ikisinin de istatistiksel olarak önemli olduğu görülecektir. Burada özellikle dikkat edilmesi gereken nokta ölen kişilerdeki ortalama IFN-α değerlerinin hem hasta olanlar hemde kontrol grubundaki kişilerden çok daha yüksek olduğudur. Literatüre baktığımızda da ölen hastalarda ki IFN seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir ve bu durum bizim çalışmamızda tespit edilen sonuçlarla uyumlu idi.

Viral yükte yaptığımız gibi hastaların ikinci serum örneklerindeki ortalama IFN-α ve IFN-β değerlerini de istatistiksel olarak karşılaştırdık (Tablo 5.7). Ancak takip sırasında ölen

hastaların ikinci kan örnekleri elde edilemediğinden sadece yaşayan hastaların kan örnekleri değerlendirmeye alınmıştır. Gruplara ait ikinci örneklerdeki IFN-α değerleri karşılaştırıldığında grup1b ve grup2'deki olgular arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$), grup1b ve grup2'deki bireylerin IFN-β ikinci değerleri karşılaştırıldığında ise gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışmaya aldığımız hastaların birinci ve ikinci kan örneklerinde tespit edilen IFN-α ve IFN-β seviyelerini de birbirleriyle karşılaştırdık (Tablo 5.8.). Grup1b'de yer alan hastalardan elde edilen birinci serum örnekleri ve ikinci serum örneklerinden elde edilen ortalama değerler karşılaştırıldığında IFN-α için ve IFN-β için saptanan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı şekilde grup2'deki olgularda yapılan ölçümlerde elde edilen IFN-α değerleri arasındaki farlılık da önemli olarak bulundu ($p<0,05$), ancak IFN-β değerleri arasındaki farklılık ve viral yük ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p> 0,05$).

Biz çalışmamızda grup1a hastalarından alınan birinci kan örneklerinde tespit ettiğimiz IFN-α, IFN-β ve viral yük'ün ortalama değerlerini ROC analizi ile değerlendirdik (Şekil 5.1, Şekil 5.2 ve Şekil 5.3). Yapılan ROC analiziyle tespit edilen ortalama kesim noktası IFN-α için 250,42 pg/ml, IFN-β için 475,95 pg/ml ve viral yük için 84455,00 kopya/ml olarak tespit edildi. Yaptığımız bu ROC analizi sonucunda elde edilen ortalama kesim noktaları incelendiğinde oluşan farklılık IFN-α ve viral yük için önemli iken ($p<0,005$), IFN-β için elde edilen ortalama kesim noktası istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$) (Tablo 5.9.). Yine ROC analizi sonucunda elde edilen sensitivite ve spesifite değerlerine baktığımızda IFN-α ve viral yük için elde edilen değerler hastaları belirleme oranı yüksek iken sağlıklı insanları belirleme oranları ise düşüktür. Yine yapılan bu istatistiksel analizde IFN-β için elde edilen değerlere göre spesifite ve sensitiviteden söz edilemez. Buna göre KKKA hastalarında birinci gün alınan serum örneklerinde ROC analiziyle tespit edilen IFN-α'nın 250,42 pg/ml'nin üzerinde olması ve tespit edilen ortalama viral yük değerinin 84455,00 kopya/ml'nin üzerinde olması durumunda ölüm oranının oldukça yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamıza dahil edilen grup1a, grup1b ve grup2'deki olgularda tespit ettiğimiz IFN-α, IFN-β ve viral yük değerleri arasında korelasyon olup olmadığını anlamak için istatistiksel korelasyon testi ile karşılaştırdık. Yapılan bu korelasyon testi sonucunda grup1a'daki olgularda IFN-α ile IFN-β arasında doğrusal bir korelasyon olduğu ($r=0,551$) ve elde edilen farkın önemli olduğu görüldü ($p<0.05$), IFN-α ile viral yük arasında da benzer şekilde doğrusal bir korelasyon olduğu ($r=0.032$) ancak aradaki farkın önemli

olmadığı görüldü ($p>0.05$). IFN-β ile viral yük arasında ise doğrusal olmayan bir korelasyon olduğu ($r= -0.030$) ve aradaki farkın anlamlı olmadığı görüldü (>0.05). Aynı şekilde grup1b'deki olgulara baktığımızda IFN-α ile IFN-β arasında doğrusal olmayan bir korelasyon olduğu ($r= -0,053$) ve elde edilen farkın önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$), IFN-α ile viral yük arasında ise doğrusal bir korelasyon olduğu ($r=0.310$) fakat aradaki farkın önemli olmadığı ($p>0.05$) ve IFN-β ile viral yük arasında da doğrusal olmayan bir korelasyon olduğu($r= -0.229$) ve burada da farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Grup2'deki olgularda elde edilen değerleri karşılaştırdığımızda ise IFN-α ile IFN-β arasında doğrusal olmayan bir korelasyon olduğu ($r= -0,086$) ve elde edilen farkın önemsiz olduğu ($p<0.05$), IFN-α ile viral yük arasında doğrusal bir korelasyon olduğu ($r=0.389$) ve aradaki farkın önemli olduğu ($p<0.05$) ve IFN-β ile viral yük arasında da doğrusal bir korelasyon olduğu ($r= 0.117$) ancak aradaki farkın önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$).

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. KKKA'lı hastalar arasında ortalama serum ALT, AST, LDH, fibrinojen ve D-dimer seviyeleri ile kan lökosit ve trombosit sayısı ile YDP skoru yönünden ölenlerle yasayanlar arasında istatistiksel olarak fark saptandı ($p<0,05$). Ancak PT ve INR değeri açısından bakıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$).
2. Bu çalışmada grup1a, grup1b ve grup2'deki hastalarda görülen somnolans, ajitasyon, kanama ve organ yetmezliği gibi semptomları açısından da gruplar arasındaki fark önemli idi ($p<0,05$).
3. Çalışmamızda tespit edilen viral yük seviyeleri ölen hastalarda yaşayan hastalara oranla daha yüksek olarak bulundu ve fark istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$).
4. Yaptığımız çalışmada grup1b'de yer alan hastalardaki birinci serum örnekleri ve ikinci serum örneklerinden elde edilen ortalama viral yük seviyeleri karşılaştırıldığında oluşan farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,05$). Ancak grup2'deki olgularda birinci ve ikinci serum örneklerinde yapılan ölçümlerde elde edilen viral yük ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$).
5. Çalışmamızda bakılan IFN-α ve IFN-β'nın ortalama seviyeleri hem grup1a hem grup1b hem de grup2'de bulunan olgularda kontrol grubunda bulunan kişilere oranla anlamlı düzeyde daha yüksek idi ($p<0,05$).
6. Aynı şekilde grup1a ve grup1b'deki olgularda bulunan ortalama IFN-α ve IFN-β seviyeleri grup2'de bulunan olgulara göre istatistiksel olarak önemli idi ($p<0,05$).
7. Ancak grup1b'deki olgular ile grup2'de bulunan olgulara ait IFN-α ve IFN-β değerleri karşılaştırıldığında elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0,05$).
8. Çalışmamızda özellikle dikkat edilmesi gereken nokta ölen kişilerde tespit edilen viral yük, IFN-α ve IFN-β seviyelerinin yaşayan hastalardan daha yüksek olmasıdır. Bu sonuç bize hastaların başvuru sırasındaki viral yük, IFN-α ve IFN-β seviyelerinin yüksek olması durumunda hastalığın daha şiddetli geçirileceği ve ölüm riskinin daha yüksek olacağı konusunda fikir vermektedir.
9. Bu çalışmada elde edilen ortalama viral yük, IFN-α ve IFN-β seviyelerinin ROC analiziyle yapılan istatistiksel incelemesi sonucunda tespit edilen ortalama kesim noktaları IFN-α için 250,42 pg/ml, IFN-β için 475,95 pg/ml ve viral yük için

84455,00 kopya/ml idi. Elde edilen bu ortalama kesim noktaları incelendiğinde oluşan farklılık IFN-α ve viral yük için önemli iken ($p<0,05$), IFN-β için önemsiz idi ($p>0,05$). Buna göre KKKA hastalarında birinci gün alınan serum örneklerinde ROC analiziyle tespit edilen IFN-α'nın 250,42 pg/ml ve ortalama viral yük değerinin 84455,00 kopya/ml'nin üzerinde olması durumunda ölüm oranının oldukça yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

10. Grup1a'daki olgularda IFN-α ile IFN-β arasında pozitif korelasyon vardı. Bu ilişkide ki katsayı önemli idi ($r=0.551$, $p<0.05$), IFN-α ile viral yük arasında da pozitif bir korelasyon vardı ($r=0.032$) ancak aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz idi ($p>0.05$). IFN-β ile viral yük arasında ise negatif bir korelasyon vardı ($r= -0.030$) ve aradaki fark önemsiz idi ($p>0.05$).
11. Grup1b'deki olgulara baktığımızda IFN-α ile IFN-β arasında negatif yönlü bir ilişki vardı ve elde edilen fark önemsiz idi ($r= -0,053$, $p>0.05$), IFN-α ile viral yük arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu ancak aradaki farkın önemsiz olduğu görüldü ($r=0.310$, $p>0.05$). Aynı hastalarda IFN-β ile viral yük arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu ($r= -0.229$) ve burada da farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).
12. Hafif gruptaki olgularda ise IFN-α ile IFN-β arasında negatif bir ilişki vardı ve elde edilen fark önemsiz idi ($r=-0,086$, $p>0.05$), IFN-α ile viral yük arasında pozitif bir korelasyon vardı ve aradaki fark önemli idi (($r=0.389$, $p<0.05$) ve IFN-β ile viral yük arasında da pozitif bir korelasyon olduğu ($r= 0.117$) ancak aradaki farkın önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$).

KKKA hastalarında viral yük ve interferonlarla ilgili az sayıda deneysel çalışma bulunmaktadır. KKKA olgularında tip 1 inferferonlar ve viral yük ile ilgili çalışmaya rastlamadık. Bildiğimiz kadarı ile bizim çalışmamız KKKA ve tip 1 interferon arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Bu nedenle KKKA hastalarında interferonların etkinliğini ve bunların virüs replikasyonunu önleyip önlemediğini göstermek için çok daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1-Korkmaz M ,Yıldırım Y,Özçelik H,Fadıloğlu Ç. Güncel Bir Sorun: Kırım-Kongo Kanamalı Atesi. Fırat Saglık Hizmetleri Dergisi, Cilt:3, Sayı:9 (2008)

2- Drosten C, Göttig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, ve ark. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, Dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol, 40(7), 2323-30, 2002.

3- Watts DM, Ksiazek TG, Linthicum KJ, Hoogstraal H. Crimean-Congo hemorrhagic fever. In Monath TP, ed. The arboviruses: Epidemiology and ecology, 2, USA, 177-260, 1988.

4- Watts DM, Ussery MA, Nash D, Peters CJ. Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro ribavirin. Am J Trop Med Hyg, 41(5), Maryland, 581-5, 1989.

5- Tignor GH ve Hanham CA. Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean- Congo hemorragic fever virus (CCHF) infection. Antiviral Res, 22(4), 309-25, 1993.

6- Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res, 64(3), 145-60,2004.

7- Mardani M, Jahromi MK, Naieni KH, Zeinali M. The efficacy of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. Clin Infect Dis, 36 (12), 1613-8, 2003.

8- Athar MN, Baqai HZ, Ahmad M, Khalid MA, Bashir N, Ahmad AM, ve ark.
Short report: Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, Am J Trop Med Hyg, 69(3), 284-287, 2003.

9- Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, Mirza S, Khurshid M, McCormick JB. Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. Lancet, 346, Pakistan, 472-475, 1995.

10- Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. Clin Infect Dis, 39, Turkey, 284-287, 2004.

11- Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. Review. Lancet Infect Dis, 6(4), Ankara, 203–14, 2006.

12- Ergönül Ö. Kırım-Kongo kanamalı atesi. Ankem Dergisi, 23, _stanbul, 234-40,2009.

13- Walker RA, Bouttaour A, Camicas JL, Estrada- Pena A, Horak IG, Latif A ve ark. Tick of Domestic Animals in Africa. A Guide to Identification of Species, The University of Edinburgh, UK: Bioscience Reports, 114, 2003.

14- Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. Proc Soc Exp Biol Med, 131(1), 233-6, 1969.

15- Elaldı N. Kırım-Kongo hemorajik atesi epidemiyolojisi. Klimik Dergisi,17 (3),Sivas, 151-56, 2004.

16- Bodur H. Kırım-Kongo kanamalı atesi ve DAS yönetimi. 5.Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Ankara, 509-520, 2007.

17- Simpson DIH. Viral haemorrhagic fevers of man. Bull Wld Hlth Org, 56(6), 819-32, 1978.

18- Le Duc JW. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. Rev Infect Dis, 11(4), 730-5, 1989.

19- Vorou RM. Crimean-Congo hemorrhagic fever in southeastern Europe. Int J Infect Dis, 13(6), Greece, 659-62, 2009.

20- Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. J Med Entomol, 15(4), 307- 417, 1979.

21- Ergonul O ve Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever:A Global Perspective. Springer, 143-54 p, 2007.

22- Gear JH. Clinical aspects of African viral hemorrhagic fevers. Rev Infect Dis, 11(4), 777-82, 1989.

23- Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG ve ark. An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994- 1995. Am J Trop Med Hyg, 57, 519-25, 1997.

24- Emond RT. Viral haemorrhagic fevers. J Infect, 13(2), 103-6, 1986.

25- Crabtree MB, Sang R, Miller BR. Kupe virus, a new virus in the family Bunyaviridae, genus Nairovirus, Kenya. Emerg Infect Dis, 15(2), Kenya, 147-54, 2009.

26- Duru F ve Fisgin T. Hematological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Turk J Hematol, 26(4), Samsun, 161-166, 2009.

27- Cagatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, Basaran S, Yenerel M, Yavuz S ve ark. Haemophagocytosis in a patient with Crimean Congo haemorrhagic fever, J Med Microbiol, 56(8), 1126-8, 2007.

28- Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R ve ark. Crimean- Congo hemorrhagic fever in Turkey, Emerg Infect Dis,10(8), 1379-84, 2004.

29- Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Dogancı L, Tulek N, Guler N ve ark. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome, Am J Hematol, 83(1), 73-6, 2008.

30- Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever, J Infect Dis, 193(7), 941-4, 2006.

31- Stickland H. Crimean-Congo hemorrhagic fever. İn tropical medicine and emerging infectious diseases, Philadelphia, 284-287 p, 2000.

32- Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, Shepherd SP, Mc Gillivray GM, Erasmus MJ ve ark. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. Am J Trop Med Hyg, 36(1), 120-32, 1987.

33- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S ve ark.The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis, 11(4),794-800, 1989.

34- Mayers D. Tickborne hemorhhagic fever, in Tickborn Infectious Diseases, Diagnosis and Management. Marcel Dekker Inc, New York, 215-31 p, 2000.

35- Swanapoel R ve Coetzer JA. Rift Valley fever. In: Royal Society (Great Britain), ed. Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, Oxford University Press, 1, New York, 1994.

36- Peters CJ, Kuehne RW, Mercado RR, Le Bow RH, Spertzel RO, Webb PA. Hemorrhagic fever in Cochabamba. Am J Epidemiol, 99, Bolivia, 425-433, 1974.

37- Bodur H. Kırım-Kongo kanamalı atesi.Ü. Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Egitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No: 55, 267-277 p., Ocak 2007.

38- Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol, 24(4), 654-6, 1986.

39- Hepherd A, Swanepoel R, Gill D. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and reversed passive hemagglutination for detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antigen. J Clin Microbiol, 26(2), 347-53, 1988.

40- Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW ve ark. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. Arch Pathol Lab Med, 121(8), 839-46, 1997.

41- Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. The use of a reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Virol Methods, 70(2), 129-37,1998.

42- Schwarz TF, Nitschko H, Jager G, Nsanze H, Longson M, Pugh RN ve ark. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. Am J Trop Med Hyg, 55(2), 190-6,1996.

43- Saluzzo J ve Le Guenno B. Rapid diagnosis of human Crimean-Congo hemorrhagic fever and detection of the virus in naturally infected ticks. J Clin Microbiol, 25(5), 922-4, 1987.

44- Burt F, Swanepoel R, Braack L. Enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. Epidemiol Infect, 111(3), 547-57, 1993.

45- Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. Epidemiol Infect, 113(3), 551-62, 1994.

46- Shepherd A, Swanepoel R, and Leman P. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis, 11(4), 801-6, 1989.

47- Tasyaran MA ve Özkurt Z. Kırım-Kongo hemorajik atesi: Tedavi ve korunma. Klimik Dergisi, 17, 157-60, 2004.

48- Borio L, Inglesby T, Peters CJ, Schmaljohn AL, Hughes JM, Jahrling PB ve ark.Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. JAMA, 287, 2391-405, 2002.

49- Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Cilt 1, Hacettepe-Tas,Ankara, 352-65 p., 1998.

50- Kaya S, Pirinçci , Tras B, Bilgili A, Baydan E, Akar F ve ark. Virusları etkileyen ilaçlar. Veteriner uygulamalı farmakoloji. Cilt 2, Ankara, 561-7 p., 1997.

51- Ustaçelebi S. Genel Viroloji. Hacettepe-Tas, Ankara, 123-38 p., 1992.

52- Koren G, King S, Knowlea S, Philips E. Ribavirin in the treatment of SARS: a new trick for an old drug? Can Med Assoc J,168 (10), 1289-92, 2003.

53- Smith RA ve Kirkpatrick W. Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent. Academic Press, London, 43–58, 1980.

54- Witkoswski JT, Robins RK, Sidwell RW, Simon LN. Design, synthesis and broad spectrum antiviral activity of 1-b-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3- carboxamide and related nucleosides. J Med Chem, 15, 1150–1154, 1972.

55- De Cabo SF, Hazen MJ, Molero ML, Fernandez-Piqueras J. S-adenosyl-Lhomocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. Experientia 50(7), Madrid, 658-9, 1994.

56- Bizollon T, Palazzo U, Ducerf C, Chevallier M, Elliott M, Baulieux J, Pouyet M, Trepo C. Pilot study of the combination of interferon alfa and ribavirin as therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. Hepatology, 26(2), 500-504, 1997.

57-Kırdar S , Ertuğrul M.B. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2009; 10(2) : 45 – 52.

58- Kansu E, Viral İmmünolojiye Genel Bakış. ANKEM Derg 2007;21(Ek 2):67-70.

59- Andersson I, Simon M, Lundkvist A, Nilsson M, Holmström A, Elgh F ve ark. Role of actin flilaments in targeting of Crimean Congo Hemorrhagic Fever virüs nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. J Med Virol.,72:83-93,2004.

60- Hewson R. Molecular epidemiology, genomics and phylogeny of CCHFV. In: Ergönül Ö, Whitehouse CA (Ed). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever A Global Perspective. Springer, Dordrect, Netherlands,45-58 pp.,2007.

61- Midilli K. Kırım Kanamalı Ateşi virüsünün biyolojik ve moleküler epidemiyolojisi. 3. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, 195-8 s.,9-13 Aralık 2007 Bursa.

62- Midilli K, Gargli A, Ergönül Ö, Şengöz G, Öztürk R, Bakar M ve ark. Imported Crimean-Congo Hemorrhagic Fever cases in İstanbul. BMC Infect Dis. 6;7:54, 2007.

63- Duh D, Nichol ST, Khristova ML, Saksida A, Bratkovic IH, Petrovec M ve ark. The complete genome sequence of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus isolated from an endemic region in Kosova. Virology Journal., 5(7): 1-6, 2008.

64- Hewson R, Chamberlain J, Mioulet V, L Lloyd G, Jamil B, Hasan R ve ark. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virüs: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses world wide. Vir Res., 102: 185-189, 2004.

65- Mardani M, Rahnavardi M, Rajaeinajad M, Naini K.H, Chinikar S, Pourmalek F ve ark. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever among health care workers ın Iran: A seroprevalence study in two endemic region. Am J Trop Med Hyg., 76(3):443-445, 2007.

66- Akgündüz S, Ergönül Ö, Kocaman I, Vatansever Z, Korten V. Changes intemperature and the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever outbreak in Turkey. 15 th. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 2-5 2005, Copenhagen, Clin Microbiol Infect, 11(S2): 360, 2005.

67- Oldfield EC 3rd, Wallace MR, Hyams KC, Yousif AA, Lewis DE, Bourgeois AL. Endemic infectious diseases of the Middle East. Rev Infect Dis., 13(Suppl 3): 199-217, 1991.

68- Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Vakaları ve Ölümlerinin Yerleşim Yerlerine Göre Dağılımı. http:// www.saglik.gov.tr/ KKKA/BelgeGoster.aspx? (Erişim 21.2.2010).

69- Gözalan A, Akın L, Rolain JM, Tapar FS, Öncül O, Yoshikura H ve ark. Epidemiological evaluation of a possible outbreak in and nearby Tokat province. Mikrobiyol Bul., 38: 33-44, 2004.

70- Bakır M, Uğurlu M, Dokuzoğuz B, Bodur H, Taşyaran MT, Vahaboğlu H. And the Turkish CCHF Study Group. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in middle Anatolia: A multicentre study of clinical features and outcome measures. J Med Microbiol., 54: 1-5, 2005.

71- Capua I. Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: A public health risk for countries of the European Union? Avian Pathology. 27: 117-20, 1998.

72- Vatansever Z, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi epidemiyolojisinde çevresel, vektörel, iklimsel değişikliklerin rolü. 3. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, 203-6 s., 9-13 Aralık 2007, Bursa.

73- Geisbert TW ve Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. Nat Med., 10: 110-21, 2004.

74- Mammen EF. Disseminated intravascular coagulation. Clin Lab. Sci., 13: 239-245, 2000.

75- Schnitler HJ ve Feldman H. Viral haemorrhagic fever- a vascular disease? Thromb Haemost., 89: 967-972, 2003.

76- Chen JP ve Cosgriff TM. Haemorrhagi fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. Blood Coagulation and fibrinolysis. 11: 461-483, 2000.

77- Ksiaazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R ve ark. Clinical virology of Ebola haemorrhagic fever (EHF): virus, virus-antigen, and IgM and IgG antibody fidings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. J Infect Dis., 179 (Suppl 1): 177-187, 1999.

78- Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD ve ark. Anslysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) haemorrhagic fever: celullar responses, viral load, and nitric oxide levels. J Virol., 78: 10370-7, 2004.

79- Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo haemorrhagic fever. Rev Infect DİS., (Suppl 4): 801-6, 1989.

80- Ardalan MR, Tubbs RS, Chinikar S, Shoja MM. Crimean-Congo haemorrhagic fever presenting as thrombotic microangiopathy and acut renal failure. Nephrol Dial Transplant., 21: 2304-7, 2006.

81- Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A. Cytokine levels in Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Clin Virol., 36 (4): 272-6,2006.

82- Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, ve ark. Pathogenesis of Ebola haemorrhagic fever in cynomolgus macgues: evidence that dendritic cells are early and sustained target of infection. Am J Pathol., 163: 2347-70, 2003.

83- Peters CJ ve Zaki SR. Role of the endothelium in viral haemorrhagic fevers. Crit Care Med., 30:268-73, 2002.

84- Joubert JR, King JB, Rossouw DJ, Cooper R. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part III. Clinical pathology and pathogenesis. S Afr Med J., 68 (10): 722-8, 1985.

85- Andersson I, Karlberg H, Mousavi-Jazi M, Martinez-Sobrido L, Weber F, Mirazimi A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virüs delays activation of the innate immune response. Journal of Medical Virology 2008; 80:1397-1404.

86- Weber F, Mirazimi A. Interferon and cytokine responses to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus; An emerging and neglected viral zonoosis Cytokine & Growth factor reviews 2008; 19:395-404.

87- Elaldi N, Kaya S, Dokmetas I, et al. Markedly elevated serum cytokine levels and high viral titers in fatal Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, Illinois, USA, 2007; Congress Book:482.

88- Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, et al. Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic fever in cynomolgus macagues: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. Am J Pathol 2003; 163: 2347-70.

89- Nallagatla SR, Hwang J, Toroney R, Zheng X, Cameron CE, Bevilacqua PC. 5' triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. Science 2007;318(5855):1455–8.

90- Andersson I. Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus: interferon-induced antiviral mechanisms and immune evasion strategies. From Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet and the Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, Sweden. 2008.

91- Elaldı N, Bakır M. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. Kimik XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. , 2005.

92- Weber F, Mirazimi A. Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zonoosis. Science Direct , 2008, 520: 10.

93- CDC. Managment of patients with suspected viral haemorrhagic fever. Morb Mortal Wkly Rep., 37 (Suppl 3): 1-16, 1988.

94- Jahrling PB, Nichol ST, Rollin PE, Ksiazek TG. Filoviruses and Arenaviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Ptaller MA, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press, Washington, 1570-1571 p., 2003.

95- Özkuyumcu C, Viral zoonozlar. In: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S, ed. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 293 s., 2004.

96- el-Azazy OM, Scrimgeour EM, Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus infection in the western province of Saudi Arabia. Trans R Soc Trop Med Hy., 91: 275-8, 1997.

97- Huggins JW. Prospects for treatment of viral haemorrhagic fevers with Ribavirin, a broad spectrum antiviral drug. Reviews of Infectious diseases. 2(Suppl. 4): 750-61, 1993.

98- Graji JD, Cameron CE. Mehanisms of action of ribavirin againts distinc viruses. Rew Med Virol., 16: 37-48, 2006.

99- Soutwick FS. Infectious Diseases A Clinical Short Course. Second edition. McGraw-Hill Press. USA, Chapter 1: 55p., 2007.

100- T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Kırım Kongo kanamlı ateşi. 1. Baskı: Ankar: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2005.

101- Duh D, Saksida A, Petrovec M, Ahmeti S, Dedushaj I ve ark. Viral load as predictör of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever outcome. Emerg Infect Dis., 13(11): 1769-72, 2007.

102- Wolfel R, Pawesta JT, Petersen N, Gobbellaar AA, Leman PA, Hewson R ve ark. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus patients. Emerg Infect Dis., 13(7): 1097-100, 2007.

103- Wassilenko SM, Vassilev TL, Bozadjiev LG, Bineva IL, Kazarov GZ. Spesific intravenous immunoglobulin for Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. Lancet. 335 (Suppl): 791-2, 1990.

104- Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo haemorrhagic fever. Antiviral Res., 78(1): 125-31, 2008.

105- Aydın K, Köksal I, Aksoy F, Yılmaz G, Sözen E, İskender S.The patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever treated with intravenous immunoglobuin. 47th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. P: V- 1908, September 17-20 2007, Chicago.

106- Engin A, Arslan S, Kızıldağ S, Öztürk H, Elaldi N, Dökmetaş İ, Bakır M. Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Mic and Infec 12 (2010) 1071-1078.

107- Ministry of Health, Turkey, Reports of the Communicable Diseases Department (2008) Ankara (Turkey) (in Turkish). Available at:http://www.saglik.gov.tr/KKKA/ BelgeGoster. aspx?

108- K. Hoebe, Z. Jiang, K. Tabeta, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, B. Beutler, Genetic analysis of innate immunity, Adv. Immunol. 91 (2006) 175e226.

109- H. Wagner, Endogenous TLR ligands and autoimmunity, Adv. Immunol.91 (2006) 159e173.

110- D.Y. Oh, K. Baumann, O.Hamouda, J.K. Eckert,K. Neumann, C.Kücherer, B. Bartmeyer, G. Poggensee, N. Oh, A. Pruss, H. Jessen, R.R. Schumann, A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression, AIDS 23 (2009) 297-307

111- G.M. Barton, Viral recognition by Toll-like receptors,Semin. Immunol. 19 (2007) 33-40.

112- Ergönül Ö, A. Çelikbaş, N. Baykam, S. Eren and B. Dokuzoğuz. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: severity criteria revisited. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 551–554.

113- Crabtree MB, Sang R, Miller BR. Kupe virus, a new virus in the family Bunyaviridae, genus Nairovirus, Kenya. Emerg Infect Dis, 15(2), Kenya, 147-54, 2009.

114- Ediotarial. Viral haemorrhagic fevers. Journal of infection disease 1986;13: 103-106

115- Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA ve ark.The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. Int J Infect Dis, 13 (3), 380-6, 2009.

116- Izadi S ve Salehi M. Evaluation of the Efficacy of Ribavirin Theraphy on Survival of Crimean-Congo hemorrhagic fever Patients: a Case-Control Study. Jpn. J. Infect. Dis., 11-15 pp., 2009.

117- NICD Annual Report. Investıgatıon of Suspected Viral Haemorrhagic Fevers (VHF). www. Nicd.ac.za/pubs/annual/ 2007/18 SPU. (Erişim 24 Mart 2010).

118- Kanadalı A, Erol S, Özkurt S, Özden K. Epidemiological risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever Patients. Türk J Med Sci., 39(6): 829-832, 2009.

119- CDC. Crimean-Congo hemorrhagic fever. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/ mnpages/ dispages/cchf.htm (Erisim Tarihi: 20 Mart 2010).

120- Villinger F, Rollin P.E, Brar S.S, Chikkala N.F, Winter J, Sundsrom J.B, Zaki S.R, Swanopel R, Ansari A.A, and Peters C.J. Markedly elevated levels of IFN-γ, IFN-α, IL-2, IL-

10 and TNF-α assosiated with fatal Ebola virus infection. The Journal of Infectious Diseases. 1999;179(Suppl1):S188-91.

121- Papa A, Drosten C, Bino S, Papadimitriou E, Panning M, Velo E,Kota M, Harxhi A and Antoniadis A. Viral Load and Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 13, No. 5, May 2007.

122- Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Çevik MA ve ark. The epidemiology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey, 2002-2007. Int J Infect Dis., 13(3): 380-386, 2009.

123- Taşdelen Fışgın N, Tanyel E, Doganci L, Tulek N. Risk factors for fatality in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Trop Doct* 2009; *39:* 158–60.

124- Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Gulderen E, Bastug A, Kubar A, *et al*. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis* 2008; *12:* 374–9.

125- Onguru P, Dagdas S, Bodur H, Yilmaz M, Akinci E, Eren S, *et al*. Coagulopathy parameters in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Clin Lab Anal* 2010; *24:* 163–6.

126- Hatipoglu CA, Bulut C, Yetkin MA, Ertem GT, Erdinc FS, Kilic EK, *et al*. Evaluation of clinical and laboratory predictors of fatality in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever in a tertiary care hospital in Turkey. *Scand J Infect Dis* 2010; *42*: 516–21.

127- Ozkurt Z, Kiki I, Erol S, Erdem F, Yilmaz N, Parlak M, *et al*. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J Infect* 2006; *52:* 207–15.

128- Duh D, Saksida A, Wraber B, Dedushaj I, Ahmeti S ve Avşiç -Zupanc T. Interacting Roles of Immune Mechanisms and Viral Load in the Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Clınıcal and Vaccıne Immunology, July 2010, p. 1086–1093, 1556-6811/10.

129- Towner, J. S., P. E. Rollin, D. G. Bausch, A. Sanchez, S. M. Crary, M. Vincent, W. F. Lee, C. F. Spiropoulou, T. G. Ksiazek, M. Lukwiya, F. Kaducu, R. Downing, and S. T. Nichol. 2004. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. J. Virol. 78:4330–4341.

130- Jahrlıng P.B, Marty A.M VE W. Geısbert T.W. Vıral H emorrhagıc F evers. Medical Aspects of Biological Warfare.

131- Peters CJ, Liu CT, Anderson GW Jr, Morrill JC, Jahrling PB. Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers: Rift Valley fever and Lassa fever contrasted. *Rev Infect Dis*. 1989;11(suppl 4):S743–S749.

132- Andersson I, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J Med Virol*. 2006;78:216–222.

133- Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, et al. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol.* 2003;77:7945–7956.

134- Valmas C, Grosch M.N, Schümann M.S, Olejnik J, Martinez O, Best S.M., Krahling V, Basler C.F., Mühlberger E. Marburg Virus Evades Interferon Responses by a Mechanism Distinct from Ebola Virus. PLoS Pathogens. January 2010, Volume 6, Issue 1, e1000721.

135- Valmas C ve Basler C.F. Marburg Virus VP40 Antagonizes Interferon Signaling in a Species-Specific Manner. J. of Virol. 2011, p. 4309–4317.

136- Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., Robertson S.J., Mitzel D.N., Park G.S., Boer E, Wolfinbarger J.B. ve Bloom M.E. Inhibition of Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of NS5 as an Interferon Antagonist. J. of Virol. Oct. 2005, p. 12828–12839.

137- Mühlberger E. Early host immune response to filovirus infection. Boston University, School of Medicine Microbiology. January 26 2012.

138- Bosio C.M., Aman M.J., Grogan C, Hogan R, Ruthel G, Negley D, Mohamadzadeh M, Bavari S ve Alan Schmaljohn A. Ebola and Marburg Viruses Replicate in Monocyte-Derived Dendritic Cells without Inducing the Production of Cytokines and Full Maturation. JID 2003:188 (1 December).

139- Bente D.A., Alimonti J.B., Shieh W.J., Gaelle C. Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model. J. of Vırol. Nov. 2010, p. 11089–11100 Vol. 84, No. 21.

140- Ergönül Ö. Türkiye'de Yeni Bir Enfeksiyon: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. Sted. 2006, cilt 15, sayı 6, 1998.

141- Bakır M, Engin A, Gozel M.G., Elaldi N, Kilickap S and Cinar Z. A new perspective to determine the severity of cases with Crimean Congo hemorrhagic fever. *J Vector Borne Dis* 49, June 2012.

142- Yilmaz G, Koksal I, Topbas M, Yilmaz H, Aksoy F. The effectiveness of routine laboratory findings in determining disease severity in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever: severity prediction criteria. *J Clin Virol* 2010; *47:* 361–5.

143- Ergönül Ö. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. Klinik Gelişim 2010: 14-27.