



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ
HASTALIĞININ TANISINDA MOLEKÜLER VE
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY(ELISA)
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Erhan KARAT
UZMANLIK TEZİ

TOKAT
2011

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ
HASTALIĞININ TANISINDA MOLEKÜLER VE
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Erhan KARAT
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YARD. DOÇ. DR. YUNUS BULUT

TOKAT
2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini ve desteğini veren tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Yunus BULUT'a, ihtisas süresince ve çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım anabilim dalımızın değerli öğretim üyesi, Sayın Doç. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ'ye ve çalışmalarım da katkısı olan herkese teşekkür ederim.

ÖZET*

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı özellikle son sekiz yılda ülkemizde insidansı ve mortalitesi en fazla artan hastalıklardan biridir. “KKKA Hastalığının Tanısında Moleküler ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemlerinin Karşılaştırılması” isimli çalışmamızda, KKKA virusunun tespiti için Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi, antijen ve antikorların tespiti için ELISA yöntemi kullanılarak erken tanıda etkinliklerinin karşılaştırılması ve hastalığın gelişimine olan etkileri yanında hematolojik ve biokimyasal parametrelerdeki değişimlerin hastalığın seyrine etkisinin tespiti amaçlanmıştır.

2010 yılında Tokat ilinde sağlık kuruluşlarına; kene ısırığı, KKKA hastalığı klinik belirti ve laboratuvar bulguları sebebi ile yatırılan 40 vakanın kan numuneleri RT-PCR ve ELISA yöntemleri ile incelenerek kaçınıcı günde (ilk 10 gün içerisinde) pozitif oldukları tespit edildi.

Bu vakaların çeşitli sosyo-demografik, epidemiyolojik verileri ve çalışma sonuçlarının istatistiksel analizleri bilgisayar ortamında SPSS v.18 programı ile değerlendirildi. Hastalarda lökopeni, trombositopeni, ALT -AST, LDH, CK yüksekliği belirlendi. Risk faktörleri olarak; endemik kırsal alanda yaşama, tarım ve hayvancılıkla uğraşma, kene teması tespit edildi. Ancak kene ısırığı vakaların %80’inde mevcuttu. Ribavirin tedavisi uygulanmayan hastalarda ölüm vakası olmadı.

RT-PCR ile hastaların 38’i pozitif, 2’si negatif olarak ilk 5 günde tespit edildi. ELISA ile pozitiflik 36 hastada (% 90) mevcut idi ve ortalama 5. günde (1.-8. günler) ortaya çıktı. Her iki yöntemle elde edilen pozitiflik düzeyi birbirine yakındı. IgM oluştuğunda lökosit sayısı, IgG oluştuğunda ise trombosit sayısında artma olmaktadır. Antijen pozitif iken (ilk 5 günde) RT-PCR da mutlaka pozitif bulunmuştur.

Erken tanıda ilk 5 günde RT-PCR antijen ve IgM ile, sonraki günlerde ise IgM ve IgG ile desteklenmelidir. RT-PCR’a yakın düzeyde duyarlılığı nedeniyle, IgM tanıda rutin uygulamaya girmelidir.

Anahtar kelimeler: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, Real Time Polimerase Chain Reaction, Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

*Bu çalışma (Proje No: 2009/58) Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

In Turkey especially for eight years Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) is a disease having a gradually increasing mortality and incidence. The name of our present study is “The Comparison of Molecular Method and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method Results in Diagnosis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF)”. In this study we aimed to compare the efficiencies of Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) methods for diagnosis of CCHF and to determine the effects to the course of disease. And also to determine the changes in haematologic and biochemical parameters as well.

RT-PCR, ELISA tests were studied on blood samples of 40 applicants with tick bite and symptoms described of CCHF collected from the Tokat city health institutions. The date of pozitivizm in ten days period was determined.

The statistical analyses of various epidemiologic, socio-demographic datas and results of the study were performed on computer by SPSS v.18 programme.

Lokopenie, trombositopeni, ALT, AST, LDH, CK enzymes increases were obvious. Living in endemic rural region, working in agricultural and stock-breeding, tick bite were the risk factors. Neverthles tick bite was only seen in patients by %80. Although ribavirin teraphy was not performed, was no fatal case seen.

By RT-PCR during the first five days 38 patients were pozitive, 2 were negative. By ELISA method IgM was pozitive in 36 patients (% 90) at fifth day-avarage-. We determined that while IgM was occurring, wbc was intending to increase, as well, and while IgG was occurring, trombosit count was intending to increase. As antigen was pozitive, PCR was also absolutely together pozitive (in first 5 days).

For early diagnosis, in first five days RT-PCR assay will be supported by ELISA method IgM and antigen, in the following days by IgM and IgG. Because of high sensivity, near to RT-PCR, IgM ELISA assay should be in routine for diagnosis.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Real Time Polimerase Chain Reaction, Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI.....	4
2.1.1.Tanım.....	4
2.2.TARİHÇE.....	4
2.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	5
2.3.1. KKKA Hastalığı Türkiye’de Vaka ve Ölümün Yıllara Göre Dağılımı.....	6
2.3.2. Hayvanlar Arasında KKKA Virusunu Yaygınlığı.....	8
2.4. VEKTÖR KENELER.....	8
2.5. VİRUS YAPISI VE REPLİKASYON.....	10
2.5.1. Virus Replikasyonu.....	15
2.5.2. KKKA Virusunun Filogenetik Gruplan ve Dünya Üzerindeki Dağılımı.....	17
2.5.3. Genetik Rekombinasyon ve Reassortment.....	19
2.6. PATOGENEZ.....	19
2.6.1. İnterferon Sentezi ve KKKA Virusunun İmmun Sistemden Kaçışı.....	23
2.7. TEŞHİS.....	23
2.8. KLİNİK.....	24
2.9. LABORATUAR TANI METODLARI.....	25
2.9.1. Viral İzolasyon.....	25
2.9.2. Antijen Aranması.....	26
2.9.3. Moleküler Yöntemler.....	26
2.9.4. İndirek Serolojik Yöntemler.....	28
2.9.4.1. ELISA.....	29
2.9.4.2. İndirek İmmün Floresan Yöntem.....	29
2.9.5. Revers Pasif Hemaglutinasyon İnhibisyonu.....	29
2.9.6. Nötralizasyon yöntemi.....	30
2.10. TEDAVİ.....	30
2.11. KORUNMA VE KONTROL.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. HASTA POPULASYONU SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	31
3.2. ÖRNEKLERİN HAZIRLANIŞI.....	32
3.3. REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU(RT-PCR).....	32
3.3.1. Yöntemin Prensibi.....	33
3.3.2. Bulunan Materyaller.....	33
3.3.3. RNA Elde Edilişi.....	33

3.3.4. Revers Transcription ve Amplifikasyon.....	34
3.3.5. Sonuçların Analizi.....	35
3.4. ELISA.....	35
3.4.1. Yöntem.....	35
3.4.2. Sonuçların Analizi.....	36
3.5. SONUÇLARIN ANALİZİ VE YORUMLANMASI.....	37
3.5.1.RT-PCRSONUÇLARI.....	37
3.5.2. ELISA SONUÇLARI.....	39
3.6.HEMOGRAM VE KOAGULASYON TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI.....	41
3.7.RUTİN BİYOKİMYASAL TESTLERİN ÇALIŞILMASI.....	42
3.8.ARAŞTIRMA VERİLERİNİN ANALİZİ.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. ÖLÜM ORANLARI.....	44
4.2. SOSYO-DEMOGRAFİK DEĞİŞKENLER.....	44
4.3. ÖYKÜ-RİSK FAKTÖRLERİ.....	45
4.4. HEMATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL İNCELEMELER.....	45
4.5. PCR VE ELISA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRMASI.....	46
5. TARTIŞMA.....	47
SONUÇLAR.....	54
KAYNAKLAR.....	57

KISALTMALAR

ALT	: Alanin Amino Transferaz
AST	: Aspartat Amino Transferaz
BFB	: Brom Fenol Blue
Bp	: Base pair
BSL-4	: Biyo güvenlik seviye-4
CCHFV	: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	: Komplamenter Deoksiribo Nükleik Asit
CER	: Hibrit böbrek/fibroblast hücre kültürü
CF-1	: Embriyonik fibroblast hücre kültürü
CK	: Kreatin fosfokinaz
cRNA	: Viral komplamenter Ribo Nükleik Asit
DEET	: N,N-dietyl-metatoluamid
DIC	: Yaygın Damar içi Pıhtılaşma
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	: Endoplazmik retikulum
FITCH	: Floresan izo tiyo siyanad
Gc/G2	: Glikoprotein-c
Gn/G1	: Glikoprotein-n
GTPaz	: Guanozintrifosfataz
IFA	: İndirek immunfloresan
IFAT	: İmmun floresan antikor testi
IFN	: İnterferon
IgG	: İmmünglobulin G
IL	: İnterlökin
IRF-3	: İnterferon düzenleyici faktör-3
kDa	: Kilo Dalton
KKKA	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
KKKAV	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusu
L protein	: RNA bağımlı RNA polimeraz
L	: Büyük segment
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LLC-MK2	: Rhesus maymun böbrek hücre kültürü
M	: Orta segment
mA	: Mili amper
MDA-5	: Melanoma differentiation-associated gene-5
MDCK-1	: Madin-Darby canine kidney 1
mg/dl	: Miligram/desilitre
MHIAF	: Mouse Hiperimmün Asidic Flui
ml	: Mililitre
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

MxA	: İnterferon indükleyici protein
N	: Nükleokapsid protein
NPV	: Negatif Prediktif Değer
NSM	: M segment nonstrüktürel protein
NSS	: S segment nonstrüktürel protein
ORF	: Açık okuma bölgeleri
OTU-like	: Ovaryan tümör benzeri
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PPV	: Pozitif Prediktif Değer
PreGc	: Glikoprotein-c prekürsörü
PreGn	: Glikoprotein-n prekürsörü
RIG-1	: Retinoic acid-inducible gene-1
RKLL	: Arginin-lizin-lösin-lösin
RKPL	: Arginin-lizin-prolin-lösin
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rNP	: Rekombinant nükleoprotein
RPHA	: Reverse Passive Hemagglutination Assay
RRL	: Arginin-arginin-lösin-lösin
RSKR	: Arginin-serin-lizin-arginin
RT	: Reverse Transcription
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
S	: Küçük segment
SKI-1/S1P	: Prolizin benzeri subtilaz
sn	: Saniye
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SW-13	: Human Caucasian adrenal cortex adenocarcinoma hücre kültürü
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
Th-1	: Yardımcı T hücreleri tip-1
TNF	: Tümör nekrozu faktörü
UV	: Ultraviole
V	: Volt
Vero	: Afrika yeşil maymun böbrek hücresi hücre kültürü
VKA	: Viral Kanamalı Ateş
µl	: Mikro litre

ŞEKİLLER

- Şekil 1.** *Bunyaviridae* viriyonunun kesitsel görünümü
- Şekil 2.** KKKA virüs kesiti ve segmentlerin şematik görünümü
- Şekil 3.** Matin suşu glikoprotein ORF şeması
- Şekil 4.** KKKAV ve Dugbe virüs L segment ORFleri
- Şekil 5.** Komplamenter 3' ve 5' uç bölgeleri
- Şekil 6.** Virus replikasyon ve transkripsiyonu
- Şekil 7.** RNA S segmentine göre filogenetik grupların dünya üzerindeki dağılımı
- Şekil 8.** S, M, L segmentlere göre filogenetik dallanma
- Şekil 9.** Viral Kanamalı ateş hastalıklarında patogenezi
- Şekil 10.** KKKA patogenezi
- Şekil 11.** Virus-antikor kompleksi oluşumunu takiben koagülasyon ve fibrinolitik aktivasyonu
- Şekil 12.** Fagosite edilmiş eritrosit ve trombosit
- Şekil 13.** KKKA hastalığının klinik ve laboratuvar seyri
- Şekil 14-15.** RT-PCR amplifikasyonunda pozitif ve internal kontrol ışımaya eğrileri
- Şekil 16-17.** Numunelerin oluşturduğu ışımaya eğrileri ve sonuçları
- Şekil 18.** ELISA yönteminde kullanılan mikrolateler

TABLÖLAR

- Tablo 1.** Türkiye 2002-2009 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayıları
- Tablo 2.** *Bunyaviridae* ailesi
- Tablo 3.** Çalışmadaki ELISA sonuçlarının optik dansite değerleri
- Tablo 4.** Vakaların sosyo-demografik değişkenlere göre dağılımı
- Tablo 5.** Vakaların öykü-risk faktörlerinin dağılımı
- Tablo 6.** PCR ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması
- Tablo 7.** PCR ve ELISA pozitiflik sayılarının günlere göre dağılımı

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı özellikle son sekiz yılda ülkemizde insidansı ve mortalitesi en fazla artan hastalıklardan biri durumdadır (1, 2). Hastalığın ülkemizde daha önce yeterince tanımlanamaması, etken virus hakkında yeterli morfolojik, epidemiyolojik bilgilerin olmaması hastalığın teşhis ve tedavisinde zorluklara ve yanlışlıklara sebep olmaktaydı. Hatta Türkiye’de 2002 yılından itibaren ilk tespit edilen vakaların Q Humması hastalığı olduğu zannedilmişti. Daha sonra hastalığın tanımlanması ile birlikte vakalara teşhis konya da görüldü ki; virusun bulaşma yolları ve taşıyıcı durumdaki bireylerin tespiti halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Önceleri enfekte kan teması ile bulaştığı düşünülüyordu, ancak diğer vücut sıvıları ve çıktıklarıyla da bulaştığı tespit edildi. Hatta aerosol yolla bile bulaşabildiği tartışılmaktadır (3-7) .

İnfeksiyon etkeni *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirus* türüne dahil olan *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* (CCHFV) dur (1, 3, 5). Genellikle *Hyalomma* cinsi enfekte kenelerin ısırması, kenelerin ezilmesi ve enfekte hayvan teması ile bulaşabilmekte olan zoonotik bir hastalıktır. Bu nedenle başta tarım ve hayvancılık sektöründe çalışanlar (çobanlar, tarlada-çiftlikte çalışanlar, mezbaşa çalışanları, veteriner hekimler, kasaplar) olmak üzere sağlık personeli arasında da hasta insanların kanları, vücut salgıları veya dokularına teması sonrası sık görülmektedir. Hastalık bu kenelerin dünyadaki dağılımı ile paralellik gösterir; Asya, Orta Doğu, Doğu Avrupa ve Afrika'da yaygındır, Amerika ve Avustralya kıtalarında ise görülmemektedir (2-9).

Bunun yanında hastalık mevsimsel özellik göstermekte, ilkbahar ve yaz aylarında sık görülmektedir (2, 8).

Bir viral kanamalı ateş hastalığı olduğundan KKKA hastalığında da bulgular nonspesifik olup; sebebi açıklanamayan ateş, halsizlik, kas-eklem ağrıları, baş ağrısı, karın ağrısı, ishal, hematemez, melena, peteşi, ekimoz, anormal kanamalar, göğüs ağrısı hastalığın ilk başvuru bulguları olabilmektedir. İlerlemiş vakalarda ise hemostazın bozulması ile birlikte şok, yaygın kanamalar ve dissemine vasküler koagülasyon (DIC) sonucu kısa sürede hastalar kaybedilebilmektedir (10-12). Hastalığın fatalite oranı

ülkemiz için % 5 olarak bulunmasına rağmen, bazı ülkelerde (İran, Irak vb) % 30'a kadar çıkabilmektedir. Özellikle son iki yılda insanların kene ısırılmalarına ve hastalığa karşı daha bilinçli yaklaşımı sonucu tanı ve tedavinin erken yapılması nedeniyle ülkemizde bu oran azalmıştır. 2010 yılı itibariyle Tokat ilinde ölümlü vaka sayısı sadece 6 olmuştur.

Bu hastalığın tanısında virusun veya virus RNA'sının kan ve doku örneklerinden izolasyonu, virus antijeninin ve virusa karşı oluşmuş antikorların serolojik olarak gösterilmesi kullanılmaktadır (3-6). Oluşan antikorlar serolojik yöntemlerden en hızlı Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile saptanabilmektedir. İmmünglobülinlerden virusa özgül İmmünglobulin G (IgG) ve İmmünglobulin M (IgM) antikorları hastalığın yaklaşık 5-6. gününden sonra serumda saptanabilmektedir. Hastalığın akut başlangıçlı nonspesifik bulgularla ortaya çıkması ve ölümcül seyrediyor olması nedeniyle tedaviyi geciktirmemek için hızlı tanı yöntemleri gerekmektedir (7).

Bazı kişilerde hastalık, özgül antikorlar kanda belirlene kadar ölümlü sonuçlanabildiğinden tanı konulamayabilir. Bu durumlarda tanı özellikle hastalığın ilk 5 gününde kan ve dokulardan alınan örneklerden virus izolasyonu ile yapılabilir. Bu amaçla hücre kültürleri, immünfloresans yöntemi, Enzyme Immun Assay (EIA) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) gibi moleküler tanı yöntemleri kullanılabilir. PCR ile bir gün içinde tanı konulabilmektedir (3-6). KKKA virusunun bir RNA virusu olması nedeniyle Revers Transcription yöntemi ile çalışan PCR kullanılması uygun yöntem olmaktadır. Klasik PCR yöntemlerindeki zorluklar ve daha geç sürede sonuçlanması nedeniyle amplifikasyon ürünü oluşurken eş zamanlı olarak ışığa yayan Real Time PCR (RT-PCR) metodu günümüzde kullanılmaktadır (13).

PCR ile virus RNA'sı tespit edilse bile hassas prosedürlerden geçmesi nedeniyle % 1-3 yalancı pozitiflik veya negatiflik verebilmesi ve serolojik olarak IgG ve IgM antikor düzeyleri başka mikroorganizmalar sebebiyle de artabildiğinden KKKA hastalığının tanısında PCR ile birlikte ELISA ile virusa özgül antikorların ve antijenin tespiti önem kazanmıştır (3- 6).

Bu amaçla 2010 yılında KKKA hastalığı öntanısı ile hastaneye yatırılan kişilerden 40 vaka seçildi. Hastaların rutin biyokimyasal ve hemogram testleri günlük olarak, ELISA hastaların başvuru veya yatışının 1.,3.,6.,10. günlerindeki kan numuneleri ile, RT-PCR ise başvuru kanı ile çalışıldı. RT-PCR yönteminde viral yük,

kalitatif olarak; ELISA yönteminde ise sonuçlar optik dansite olarak değerlendirildi.

Veriler incelenerek RT-PCR yöntemi ile ELISA yöntemlerinin erken tanıda etkinlik düzeylerinin karşılaştırılması, günler boyunca IgM ve IgG'nin tespitinin hastalığın seyri ile olan ilişkisi ayrıca klinik olarak hematolojik ve biokimyasal parametrelerdeki değişimlerin hastalığın seyrine etkisinin tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI

2.1.1. Tanım

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı, genellikle *Hyalomma* cinsi enfekte kenelerin ısırması, kenelerin ezilmesi ve enfekte hayvan teması ile bulaşabilmekte olan, zoonotik bir viral kanamalı ateş (VKA) hastalığıdır. Etken, *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirus* türüne dahil olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusü (KKKAV) dur. Hastalık ateş, kanama, şok ve ölüm ile seyreder (1-5).

VKA terimi adı altında *Bunyaviridae* (Kırım-Kongo kanamalı ateş virusu, Rift Vadisi ateşi virusu ve Hanta virus) , *Flaviviridae* (Yellow fever virusu ve Dang virusu), *Filoviridae* (Marburg, Ebola virusu), *Arenaviridae* (Lassa virus, Junin, Machupo, Sabia, Guanarito virusları) bulunmaktadır ve bunlar coğrafik olarak sınırlı çok sayıda virus ile ilişkili hastalığı yansıtmaktadır (13). KKKA, Türkiye’de bugüne kadar saptanan tek VKA’dır (14).

2.2.TARİHÇE

Son elli yılda dünyanın haberdar olduğu bu hastalık aslında o zamanlar için yeterince tariflenememekle birlikte eski belgelerde kaydı vardı. 12. Yüzyılda Orta Asya’da Zeyn ed-Din ebu İbrahim İsmail ibn Muhammed el-Hüseyini el-Curcani tarafından kusmukta, dışkıda, idrarda, balgamda, kan ve karın boşluğunda kanama ile seyreden bir kanamalı hastalık belirtilmiştir. Siyah bir kuşun normal bir paraziti olan, küçük bit veya kene gibi bir arthropodun bu hastalığın sebebi olduğunu belirtmiştir. O dönemde hastalığı taze keçi sütü ve çeşitli bitki esansları ile tedavi etmeye çalışmışlardı. Daha sonra “Karakhalak (kara ölüm)”, “Khunymuny (burun kanaması)”, gibi isimlerle anılmıştır (15).

20. yüzyılda ise ilk kez Kırım’da köylülere tarlalarında yardım eden 200 Sovyet askerinde 1944-1945 yıllarında bu hastalık görülmüştür (4, 16). Hastalığın kene ile ilişkisi tespit edilmiş ve hastalığa Kırım Hemorajik Ateşi ismi verilmiştir. Daha sonraki yıllarda virus *Hyalomma marginatum marginatum* kene türünden ve hasta kanından izole edilmiştir. 1956 yılında Zaire’de Kongo virusu izole edilmiştir (8, 16).

1967 yılında Simpson ve arkadaşları 5’i laboratuvar kaynaklı 12 sarılıklı hastanın

serumlarını yenidoğan farelere enjekte ederek, virusu tanımlamıştır (8). Bu araştırmacılar Kongo virusu ile Kırım'da tespit edilen virusun aynı serolojik özellikte olduklarını ve dolayısı ile aynı virus olduklarını bildirmişlerdir (8, 12). Moskova'da Poliomyelit ve Viral Ensefalitler Enstitüsünde Chumakov-Butenko ve arkadaşları 1967'de virus izolasyonunda ilk kez yenidoğan beyaz fare ve yenidoğan beyaz ratları kullanarak KKKA virusunu izole ettiler ve kompleman fiksasyonu yöntemi ile doğruladılar. Bu metod ile Astrakhan'da Drostov isimli hastadan izole edilen Drostov suşu deneysel çalışmalarda prototip suş olarak kullanılmaya başlandı. Bu suş serolojik antikor-antijen üretimi, farklı coğrafik bölgelerden virus tanımlanması ve sınıflandırılması imkanı sağlamıştır (2, 4).

Donets 1974'de elektron mikroskopik olarak virusu tespit etmiş ve boyutlarını 100-300 nm olarak bildirmiştir. Donets ve Chumakov, Korolev ve arkadaşları tek zincirli bu Ribo Nükleik Asit (RNA) virusunu morfogenez olarak tipik *Bunyaviridae* ailesi üyesi olarak görmüşlerdir (4).

İlerleyen yıllarda hastalığın Afrika'nın doğu, batı ve güneyinde yaygın olduğu, Asya' da İran, Pakistan, Güney Çin, Hazar Denizi etrafı ve Arap yarımadası, Güney Rusya ve Güneydoğu Avrupa ülkelerinde görüldüğü bildirilmiştir (8).

Ülkemizde ise ilk kez 2002 yılında Tokat başta olmak üzere Çorum, Sivas, Yozgat illeri ve civarından bildirilmiştir. Başvuran vakalarda Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimleri yüksekliği, lökopeni ve trombositopeni olduğu tespit edilmiş ama başka hastalıklar olabileceği düşünülmüş ancak 2003 yılında hastalığın KKKA hastalığı olduğu doğrulanmıştır (8, 15).

2.3.EPIDEMİYOLOJİ

Hastalık ilk kez Kırım bölgesinde 1945'te keşfedildi ve günümüzde (Amerika ve Avustralya kıtaları haricinde) Orta Doğu, Asya, Güney Doğu Avrupa, Afrika'da da tespit edilmiştir. KKKA virusu kene kaynaklı olup, bu kenelerin yaygın dağılımı ile doğrudan ilgilidir ve geniş bir coğrafyayı etkilemektedir (8, 14). Bu sebeple salgınlara da neden olabilmektedir. 1970 yılından önceki vaka bildirimlerinin çoğu eski Sovyetler Birliği ülkeleri (Kırım, Astrakhan, Rostov, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan), Afrika'nın bazı bölgeleri(Uganda ve Kongo) ve Bulgaristan'dan gelmekteydi (14). Virus

geniş bir coğrafyada epidemilere ve salgınlara neden olmuştur. Bu alan Çin'in Xinjiang bölgesi, Orta asya, İran, Pakistan, Ortadoğu ülkeleri, Kırım, Güney Rusya, Balkanlar, Afrika'nın doğu, batı ve güneyini kapsamaktadır. KKKA virusu Balkanlar'da; Bulgaristan, eski Yugoslavya, Arnavutluk'ta endemiktir. Buna göre KKKA hastalığı, viral kanamalı ateşler arasında dünya coğrafyasında en yaygın olarak görüleni ve ülkemizde de saptanan tek viral kanamalı ateştir (14). Bilinen ilk salgın 1965 yılında Çin'de meydana gelmiştir ve % 80 fatalite görülmüştür (20).

2000'li yıllarda başta Türkiye olmak üzere İran, Pakistan, Balkanlar ve Afrika'dan yeni salgınlar rapor edildi (21). KKKA virusunun serolojik kanıtları ise Hindistan, Mısır, Portekiz, Macaristan, Fransa, Benin ve Kazakistan'dan bildirilmiştir (22, 23).

KKKA virusunun yaygın vektörü *Hyalomma* genusu keneleridir. Virus insanlara hem *Hyalomma* kenelerinin, hem de enfekte evcil hayvanların doğrudan teması ile yayılır. KKKA virusu bir zoonozdur ama hastalığın tanımlandığı tek konakçı insandır. Sığır, koyun ve keçilerde enfeksiyondan sonra bir hafta viremi gelişir. Bu periyod boyunca virus hayvanlar ile teması olan tarım çalışanlarına, veterinerlere ve mezbaha işçilerine bulaşabilir ve hayvan ticareti ile virus diğer coğrafi bölgelere yayılabilir (14).

Hastane ortamlarında insandan insana virusun yayılımı olabilir. Bu nedenle sağlık çalışanları risk altındadır (6, 8).

2.3.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Türkiye'de Vaka ve Ölümün Yıllara Göre Dağılımı

Ülkemizde 2002 yılından beri KKKA hastalığı sebebiyle çoğu özellikle Tokat ili ve çevresinde olmak üzere artan sayıda vaka ve ölüm bildirimi yapılmıştır (14).

Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 2002– 2009 yılları arasında 4453 vaka görülmüş, toplam ölüm sayısı 218 dir (Tablo 1). Fatalite oranı % 5'tir (24).

Tablo 1: Türkiye 2002-2009 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayıları.

Yıllar	Vaka Sayısı	Ölüm
2002-2003	150	6
2004	249	13
2005	266	13
2006	438	27
2007	717	33
2008	1315	63
2009	1318	63
TOPLAM	4453	218

*2010 verileri yayınlanmamakla birlikte Tokat ili 2010 yılı vaka sayısı 252, ölüm ise 6 dır. 168'inin PCR sonucu pozitif. (Bu veriler Ağustos ayına kadar olan vakalarıdır. Bununla birlikte ağustos ayından sonra Sağlık Müdürlüğü'ne ulaşan kayda değer vaka olmamıştır)

** Tokat ili 2009 yılı vaka sayısı 306, ölüm sayısı ise 10 idi. 211'inin PCR sonucu pozitif.

Hastalık ülkemizde özellikle mart-nisan aylarında görülmeye başlayıp mayıs, haziran, temmuz ve ağustos aylarında en fazla görülmektedir. Hastalığın ülkemizde erkek ve kadın cinsi arasında benzer oranda olduğu görülmüştür (25). 2009 yılı itibariyle cinsiyet bilgilerine ulaşılabilen 1299 vakanın 717'si (% 55) erkek, 582'si (% 45)ise kadındır.

2.3.2. Hayvanlar Arasında KKKA Virusü Yaygınlığı

Türkiye’de Tarım Bakanlığı’nın raporuna göre endemik bölgelerde bulunan sığır, koyun ve keçilerde % 25’in üzerinde seropozitiflik bildirilmiştir. Aynı raporda ayrıca Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi tarafından yapılan araştırmada Tokat ve Yozgat’ın köylerinden toplanan sığır serumlarında % 79 oranında seropozitiflik saptandığı belirtilmiştir (27). Daha önce yapılmış bazı çalışmalarda İran’da 88 evcil hayvanda (koyun, sığır, keçi) yapılan bir çalışmada toplam % 37,9 seropozitiflik bulunduğu bildirilmiştir (28). Umman’da yapılan diğer bir çalışmada 489 evcil hayvanın 108 (% 22)’inde KKKA virusu seropozitif bulunmuştur (29). Suudi Arabistan’da da koyun, keçi ve sığırlarda seropozitiflik gösterilmiştir (30).

2.4. VEKTÖR KENELER

KKKA virusunun esas taşıyıcısı ve rezervuarı kenelerdir. Keneleri, dünyanın her bölgesinde görmek mümkündür, dünyanın bütün kara parçalarında bulunan ve karada yaşayan eklembacaklıların en kalabalık grubunu oluşturan canlılardır (31). 899 türü izole edilmiştir. Türler morfolojik, biyolojik ve davranış biçimlerine göre *Ixodidea* (713 tür), *Nuttalliellidae* (1 tür) ve *Argasidae* (185 tür) olmak üzere 3 aile tariflenmiştir (32). Virus izole edilen kenelerin tümü *Ixodidea* ve *Argasidae* ailesi içerisinde yer almaktadır ve KKKA virusunun başlıca vektörleridir (32). Özellikle *Hyalomma marginatum* başta olmak üzere aralarında *Hyalomma truncatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Hyalomma impeltatum*, *Hyalomma impressum*, *Amblyomma variegatum* ve *Boophilus decoloratus* türü de olan 30 kadar kene türünden KKKA virusu izole edilmiştir (33). Türkiye’de *Ixodidea* ve *Argasidae* ailelerinden 32 tür tanımlanmıştır (33). Kelkit vadisinde yapılan bir çalışmada en fazla bulunan kene türü, *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus bursa* olmuştur (34). Ayrıca Nijerya’da sığır yaşam alanlarında yakalanan tatarcıkta sindirilmemiş kandan virus izole edilmiştir (4, 6).

Keneler yaşamları süresince değişik canlılar üzerinde (yerden beslenen kuşlar, küçük kemirgenler, sürüngenler, çiftlik hayvanları veya büyük yabani memeli hayvanlar ve insanlar) zorunlu ektoparazit olarak bulunurlar. Beslendikleri konak sayısı genellikle türe bağlı olarak 1-3 arasında değişebilir. Yumurtadan çıkan larvalar ilk konakta kan

emdikten sonra nimf haline gelirler. Daha sonra başka bir konağa geçerek veya aynı konak üzerinde beslenerek erişkin kene haline gelirler (27).

Virus kenelerde yaşamları boyunca (1-1,5 yıl) kalabilmekte, venereal, transovaryal ve transstadial (larvadan nimfe, nimfden erişkine) olarak yeni nesillere geçebilmektedir (14). Evcil ve yabani hayvanlar virusu aldıklarında 7-10 gün vücutlarında barındırırlar ama hasta olmazlar. KKKA hastalığının insanlara en önemli bulaşma yolları, enfekte kenelerin kan emmesi veya el ile ezilmesi, taze kesilmiş viremik hayvanların vücut sıvıları ve dokuları ile temas ve enfekte insanların vücut sıvıları ile temasıdır (35).

KKKA virusunun en sık görülen vektörü *Hyalomma marginatum marginatum*'dur. Türkiye'nin de içinde bulunduğu coğrafyada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bu kenelerinin Türkiye üzerindeki dağılımı iklimsel yapı ile alakalıdır. Özellikle iklim geçişinin olduğu Tokat, Sivas, Yozgat, Çorum, Gümüşhane, Çankırı, Samsun, Bolu illeri civarında yoğunlaşmaktadırlar (14).

2.5. VİRUS YAPISI ve REPLİKASYON

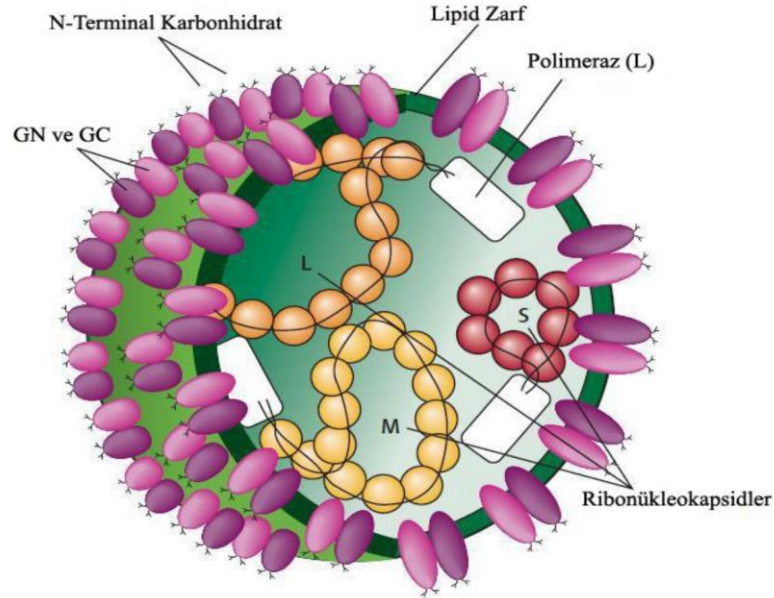
KKKA virusu *Bunyaviridae* ailesindedir. *Bunyaviridae* ailesinde *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* olmak üzere 6 farklı genusta 300'den fazla virus bulunmaktadır (Tablo 2) (36).

Tablo 2. *Bunyaviridae* ailesi

<p><i>Bunyaviridae</i>;</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bunyavirus</i> 2. <i>Nairovirus</i> <ol style="list-style-type: none"> a. <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> b. <i>Dera Ghazi Khan virus</i> c. <i>Dugbe virus</i> d. <i>Hughes virus</i> e. <i>Qalyub virus</i> f. <i>Sakhalin virus</i> g. <i>Thiafora virus</i> 3. <i>Hantavirus</i> 4. <i>Phlebovirus</i> 5. <i>Tospovirus</i> 6. <i>Orthobunyavirus</i>

Nairovirus grubunda 7 farklı serogrupta 34 virus bulunmaktadır. Bunlar içerisinde *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, KKKA hastalığına neden olmaktadır. *Dugbe virus* ise koyun ve keçilerde primer patojen olmalarına karşın insanlarda da ateş ve trombositopeni yaptığı gözlenmiştir (36).

KKKA hastalığı virusu bir RNA virusudur ve zarf kalınlığı yaklaşık 5-7 nm'dir. Virus çapı 80-120 nm'dir. Genomu tek zincirli, helikal ve sirküler yapıda, üç parçalı (L,M,S) ve negatif polariteli bir yapıya sahiptir (Şekil 1) (6). Yüzeyinde yaklaşık 8-10 nm uzunluğunda iki glikoprotein çıkıntı bulunmaktadır (Gn ve Gc). Bunlar eritrositleri hemaglutine etme özelliğinde olup, virionun tutunmasından ve nötralizan antikorların indüksiyonundan sorumludurlar (37).



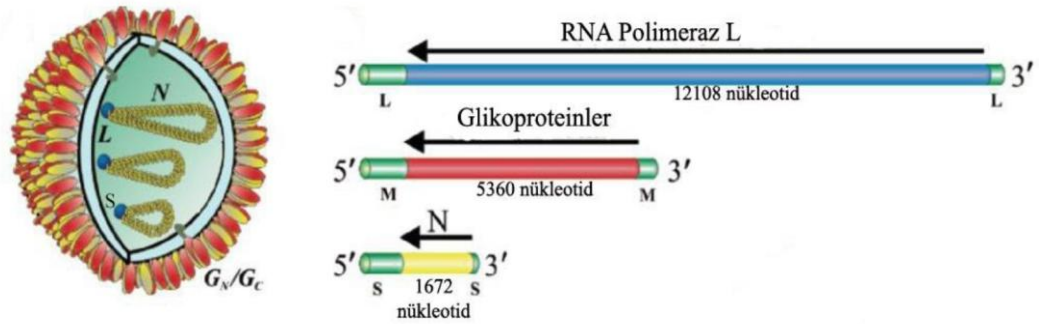
Şekil 1. *Bunyavirideae* viriyonunun kesitsel görünümü (2,3)

RNA'nın toplam moleküler ağırlığı 5×10^6 daltondur. S segmenti: 0.28×10^6 - 0.50×10^6 dalton, kodladığı nükleokapsid (N) polipeptid (19×10^3 - 25×10^3 dalton), M segmenti: 1.8×10^6 - 2.3×10^6 dalton, kodladığı iki glikoprotein (G), G1/Gn (108×10^3 - 120×10^3 dalton) ve G2/Gc (29×10^3 - 41×10^3 dalton). L segmenti: 2.7×10^6 - 3.1×10^6 daltondur (76,77). Elektron mikroskopide bakıldığında, belli bir düzende yerleşmemiş merkezi boşluklar göstermeyen çok küçük morfolojik yüzey birimlerine sahip olmalarından

dolayısı diğerk bunyaviruslerden farklı görölmektedir (6). Üç genom segmenti de açık okuma bölgeleri (ORF) yanında kodlamayan bölgeler de içerir.

Dört yapısal protein (Şekil 2) kodlanır:

- L protein: L segmentinin (12.108 nükleotid) kodladığı RNA bağımlı RNA polimeraz
- G1ve G2: M segmentinin (5360 nükleotid) kodladığı glikoproteinler olan Gn ve Gc
- N proteini: S segmentinin (1267 nükleotid) kodladığı nükleokapsid protein (37).

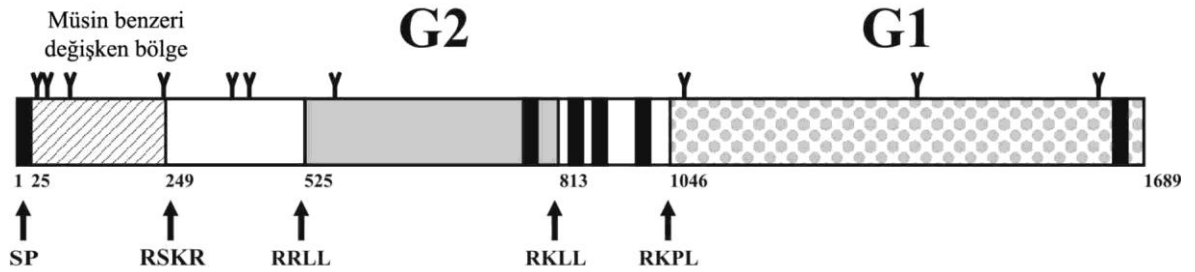


Şekil 2. KKKA virus kesiti ve segmentlerin şematik görünümü (37)

Kırım Kongo virusu hücre içinde aktin filamentleri ile etkileşir. Nükleoproteinler perinükleer bölgeyi hedeflerler ve enfekte hücrenin perinükleer bölgesine lokalize edilir. KKKA virusu nükleoproteinleri golgi membranlarına bağlı bir protein gibi eksprese edilmez, aktin filamentleri ile ilişkilidir (38).

Bu üç genom segmenti (L, M, S) nükleoprotein ve viral RNA polimeraz ile ribonükleoprotein şeklinde kapsidlenmiştir (6,38). M segmenti tarafından kodlanan poliprotein, kotranslasyonel yarımla ile PreGn ve PreGc olarak iki prekürsör moleküle ayrılır. Bunlar da postranslasyonel işlem ile Gn ve Gc olarak iki matür glikoproteine dönüşür. Matür Gn ve Gc glikoproteinleri dikensi yapıda lipid zarf arasına girer ve konak hücrenin şu ana kadar bilinmeyen reseptörlerine virionun tutunmasından ve nötralizan antikörlerin indüksiyonundan bu glikoproteinler sorumludur (6, 38). Sanchez ve arkadaşlarının Matin suşu ile yaptığı çalışmada, M segmentinin 1689 aminoasid uzunluğunda poliprotein prekürsörü kodladığı, bunun karboksi terminal ucundan 1441 aminoasid bölgenin nispeten korunmuş olduğu, amino uç (N-terminal) 243-248 aminoasid bölgenin müsin benzeri değışken bölge

(Şekil 3) içerdiğini göstermiştir (39). Yine bu çalışmada glikoprotein prekürsörlerinin proteolitik sürecinden sorumlu bir hücrel proteaz olan SKI-1/S1P subtilaz, olgun Gn'nin N- terminal eklenmesi işleminden sorumlu hücrel proteaz olarak tanımlanmıştır. Bu enzim şekilde görülen arginin-arginin-lösin-lösin (RRL) ve arginin-lizin-prolin-lösin (RKPL) tetrapeptid bölgelerini tanıyıp klevaj işlemini gerçekleştirir. Arginin-lizin-lösin-lösin (RKLL) ve arginin-serin-lizin-arginin (RSKR) sekanslı iki klevaj bölgesinden başka bir hücrel proteaz olan furin sorumludur. M segmentinden müsin benzeri bölgeyi de kodlayan 140 kDa Gn prekürsör ve 85 kDa Gc prekürsörden klevajlar ile 75 kDa Gn ve 37 kDa Gc olgun proteinler oluşur. İlaveten M segment poliprotein içinde Gn kodlayan sekansın yerleşiminin upstreaminde ve değişken müsin benzeri bölgenin downstreaminde yerleşmiş bir ORF tarafından kodlanan nonstrüktürel protein olan Gp 38 bulundu. Bu proteinin moleküler ağırlığı 38 kDa idi ve virus patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmüştür (40, 41).

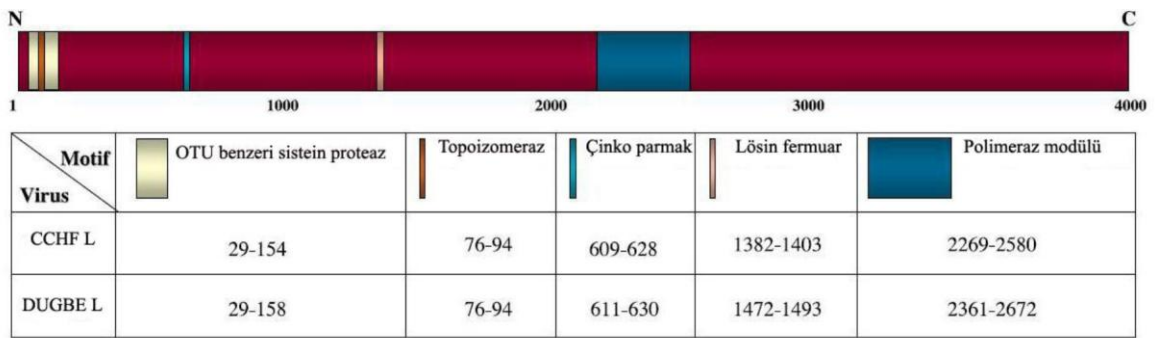


Şekil 3. Matin suşu glikoprotein ORF şeması (SP: sinyal peptid bölgesi) (39)

Viral glikoproteinler etkilenen hücrelerin reseptör alanlarına bağlanmasından sorumlu olduğu kabul edilir. Virusun hücreye tutunmasını takiben endositoz ile içeri girişi olur. Bunyaviruslarda replikasyon stoplasmada olur ve endoplazmik retikulum boyunca sitoplazmik veziküller içinde golgi membranlarından tomurcuklanarak olgunlaşır. Bu tomurcuklanma bölgesinin glikoprotein Gn ve Gc'nin biriktiği bölgeler olduğu gözlenmiştir. Gn glikoproteini sinyal tutulması ile golgi kompleksine lokalize olduğu, buna karşın Gc glikoproteininin endoplazmik retikulumda kaldığı ve Gn glikoproteini

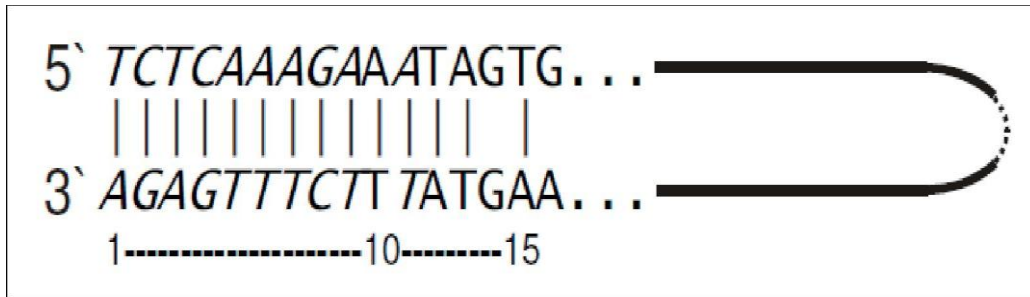
ko-ekspresyonu ile salınabileceği gösterilmiştir (41). Ebola virus glikoproteini mûsin benzeri domaini vasküler endotel hücre kaybı ve permabilite artışına sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer etki KKKK virusu glikoproteinlerinde de mevcuttur (39).

L segment Polimeraz modülü içerisinde daha fazla korunmuş bölgeler gözlenmiştir. Ovaryan tümör benzeri sistein proteaz (OTU-like cysteine protease) ve helikaz domainler (Çinko parmak ve Lösin fermuar motif) içeren bölgeler KKKK virusu L segmentinde ve Dugbevirus'te de gösterilmiştir (Şekil 4) (42, 43).



Şekil 4. KKKAV ve Dugbe virus L segment ORFleri (42)

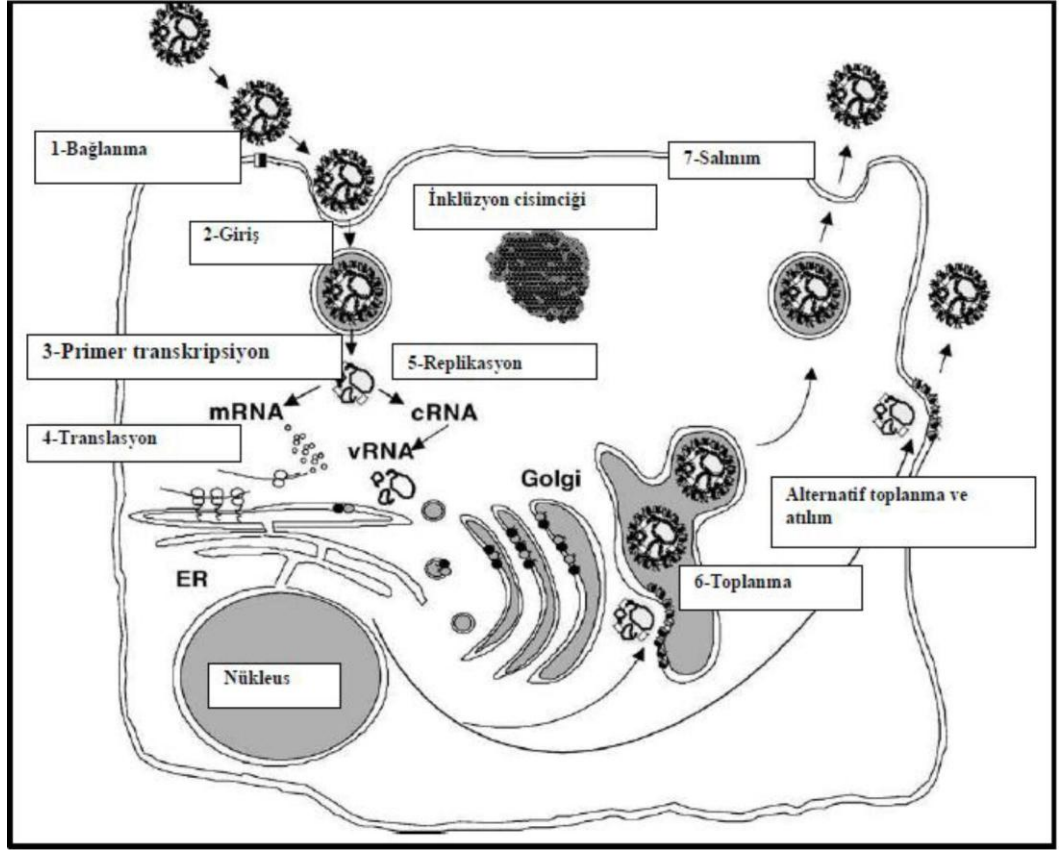
Üç RNA segmentinin her birinde, 3'AGAGUUUCU... şeklinde 3' terminalinin ilk 8-13 nükleotidi "tava sapı" görünümü mevcuttur ve diğer Bunyaviruslar arasında da benzer yapıda görülmektedir. Özellikle ilk ve son 9 nükleotid segmentleri (3' ve 5' uçları) yüksek derecede birbirlerini komplementerlik gösterirler (Şekil 5). Bu bölgenin RNA polimeraz enzimi bağlanmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (41).



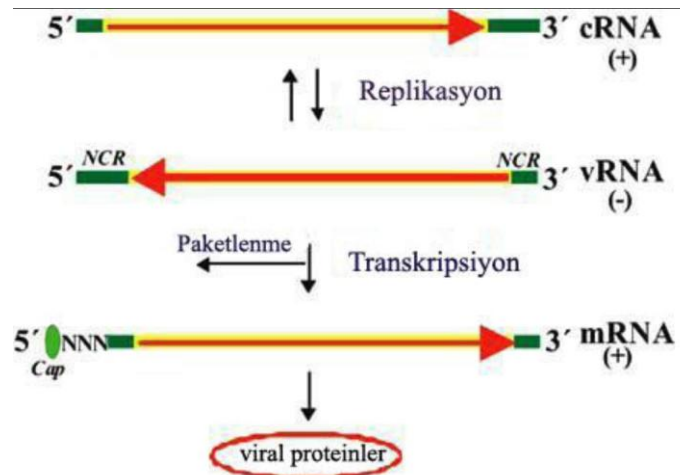
Şekil 5. Komplementer 3' ve 5' uç bölgeleri

2.5.1. Virus Replikasyonu

Viral replikasyon birbirini izleyen 7 temel basamakta meydana gelmektedir (6).



Virus replikasyonu



Şekil 6. Virus replikasyon ve transkripsiyonu

1. Bağlanma: Viral proteinlerin konakçı reseptörleri ile etkileşimi ve bağlanma,
2. Giriş: Reseptör aracılı endositozla hücreye giriş,
3. Primer Transkripsiyon: Endozomal membran viral membran füzyonu ile endositik veziküllerin asidifikasyonu sonucu kapsid soyulması. Konakçı hücrede türeyen primerler ve virionla ilişkili polimeraz kullanılan genom kalıplarından viral komplementer (cRNA) erken mRNA türlerinin primer transkripsiyonu,
4. Viral Proteinlerin Translasyonu:
 - M segment poliproteinini kotranslasyonel parçalanması
 - Endoplazmik Retikulumdaki (ER) Gc ve Gn'nin dimerizasyonu
5. Genom Replikasyonu: Çift anlamlı, genler için kalıp vazifesi gören cRNA'nın sentezi, cRNA aracılıklı vRNA replikasyonu ve kapsitle çevrilmesi/mRNA sentezlenmesi,
6. Toplanma: Dış yapının gelişen kısımlardaki nükleoprotein yerinin belirlenmesi, dimerleşen Gn ve Gc'nin golgiye taşınması, glikozilasyon, modifiye edilmiş konakçı membranlarının elde edilmesi (genellikle golgi sisternasından),
7. Salınma: Plazma membranı ile virus içeren sitoplazmik veziküllerin füzyonu ve olgun virionların salınması, daha seyrek olarak bazı hücre tiplerindeki virusların, doğrudan konakçı hücresinin plazma membranından tomurcuklanarak salınır (44).

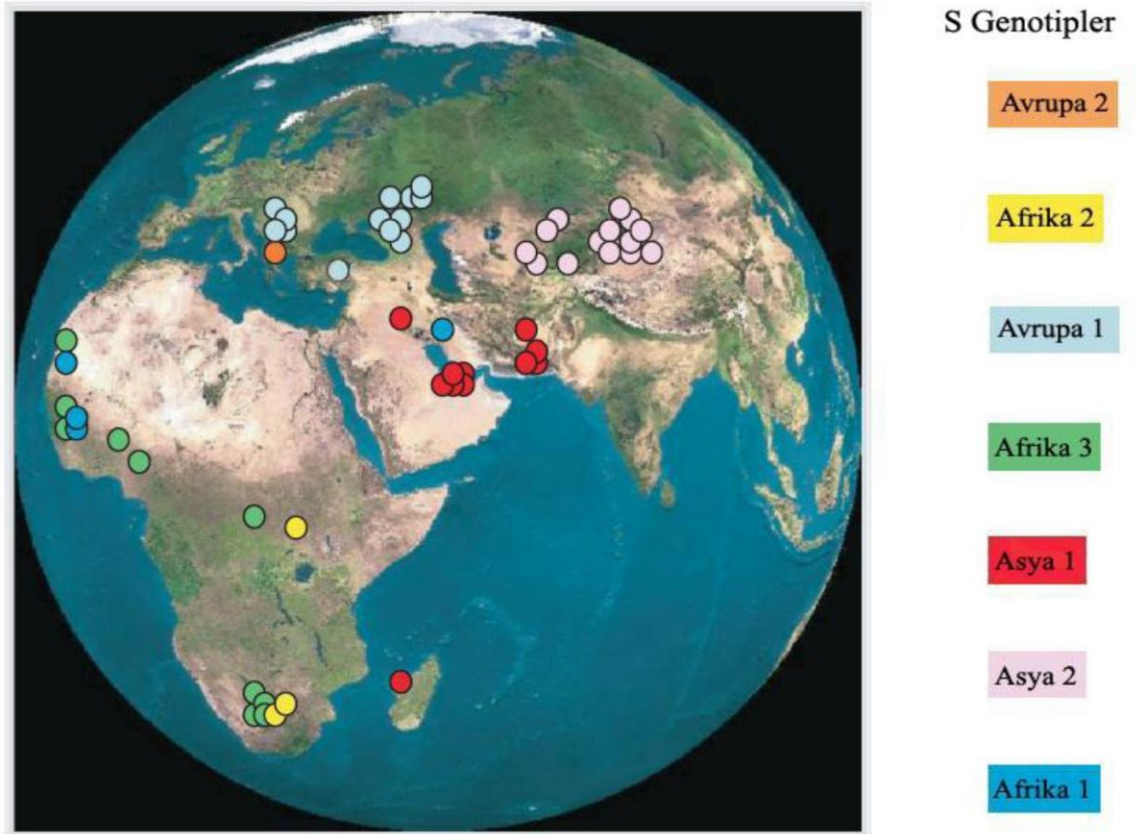
KKKA virusunun ters genetik sistemini de kullanarak replike olabilmesi hücre ve konakçı tropizminin primatlarla sınırlı kalmasına neden olmaktadır (45).

KKKA virusu nativ RNA segmentleri ve viral kodlanmış glikoproteinler yokluğunda, viral nükleoproteinler enfekte hücrenin perinükleer bölgesinde aktin filamentelerini hedeflemektedir. KKKA virus nükleoproteinleri golgi membranına bağlı proteinler gibi ifade edilmezler. İnsan MxA proteininin nükleoproteinler ile etkileşimi hücre kültürlerinde virus replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (46). İnterferon indükleyen MxA GTPaz aracılığı ile interferon-alfa tarafından KKKA virusun gelişimi inhibe edilebilmiştir (47).

2.5.2. KKKA Virusunun Filogenetik Grupları ve Dünya Üzerindeki Dağılımı

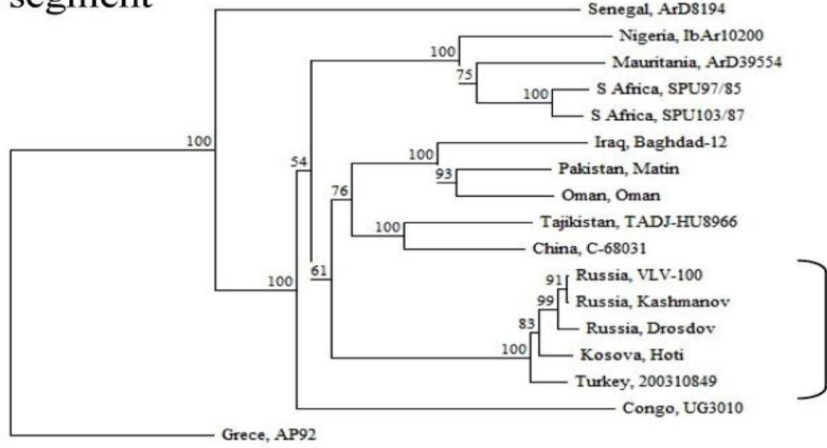
KKHA virusu türleri içinde çok az değişiklik olduğu serolojik testlerle ortaya konmuştur. Genetik farklılıklar nükleik asit sekans analizine dayanan çalışmalarda gösterilmiştir (6, 48).

S segment analizlerine göre, Türkiye’de bulunan suş, Avrupa/Türkiye grubu olan 5. grupta yer almaktadır (49). Morikawa ve arkadaşları M segment analizlerine göre 6 farklı filogenetik grup göstermiştir (50). Türkiye’de bulunan suş, Rusya ve Kosova’da bulunan suşlar ile aynı M4 grubunda yer almaktadır. Duh ve arkadaşları S, M ve L segment analizlerinde V.grup olarak Avrupa/Türkiye suşunu göstermişlerdir. Rusya, Kosova ve Türkiye suşları (Şekil 8) arasında oldukça yüksek düzeyde benzerlik bulunmaktadır (51).



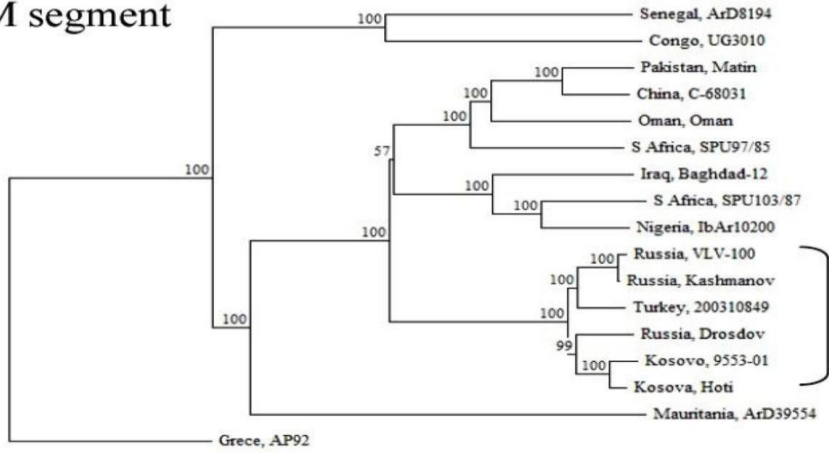
Şekil 7: RNA S segmentine göre filogenetik grupların dünya üzerindeki dağılımı (52)

S segment



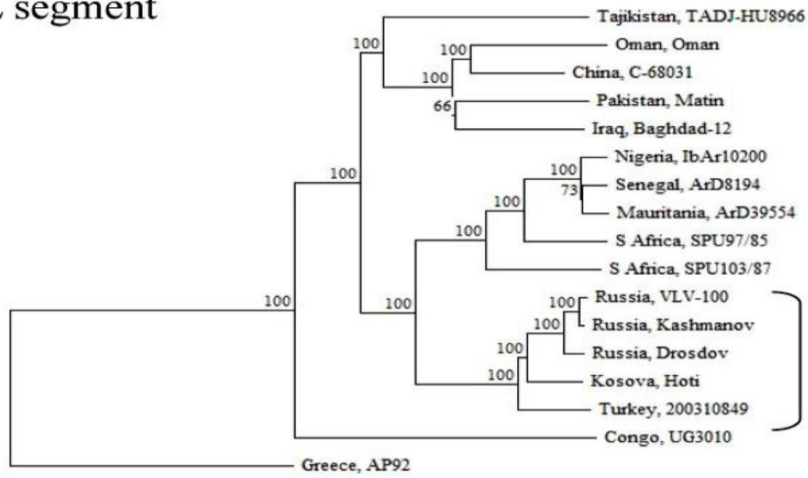
V. grup
Avrupa/Türkiye

M segment



V. grup
Avrupa/Türkiye

L segment



V. grup
Avrupa/Türkiye

Şekil 8. S, M ve L segmentlerine göre filogenetik dallanma (51)

2.5.3. Genetik Rekombinasyon ve Reassortment

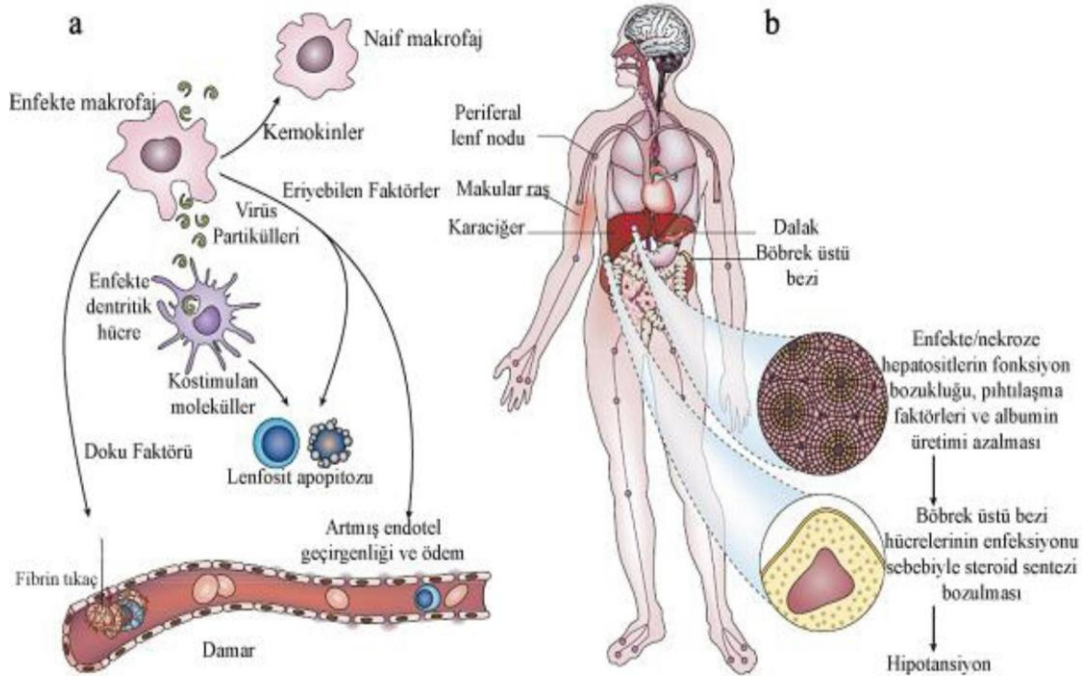
Filogenetik analizler rekombinasyon ve reassortmentın olabileceğini göstermektedir (53, 54).

Farklı ama yakın ilişkili iki bunyavirusun aynı hücreyi enfekte etmeleri halinde, stoplazmada farklı kombinasyonlarda paketlenmeleri, sekiz farklı progenivirus meydana gelmesi, bunlardan ikisinin parental virus ile benzer altısının reasortan, genetik olarak farklı yapıda progenivirus olduğu görülmektedir (53, 54).

Keneler enfekte kuşlarla uzak coğrafik bölgelere KKA virusları taşıyabilir ve çoğunlukla M segmenti olmak üzere reassortment gerçekleşebilir (48, 50).

2.6. PATOGENEZ

Virusun ana hedefleri; endotel hücreleri, mononükleer fagositler, hepatositler ve dalaktır. Ayrıca direk viral sitopatik etki ile hücre hasarı sonucu karaciğer parankimal nekrozu oluşturur (55).



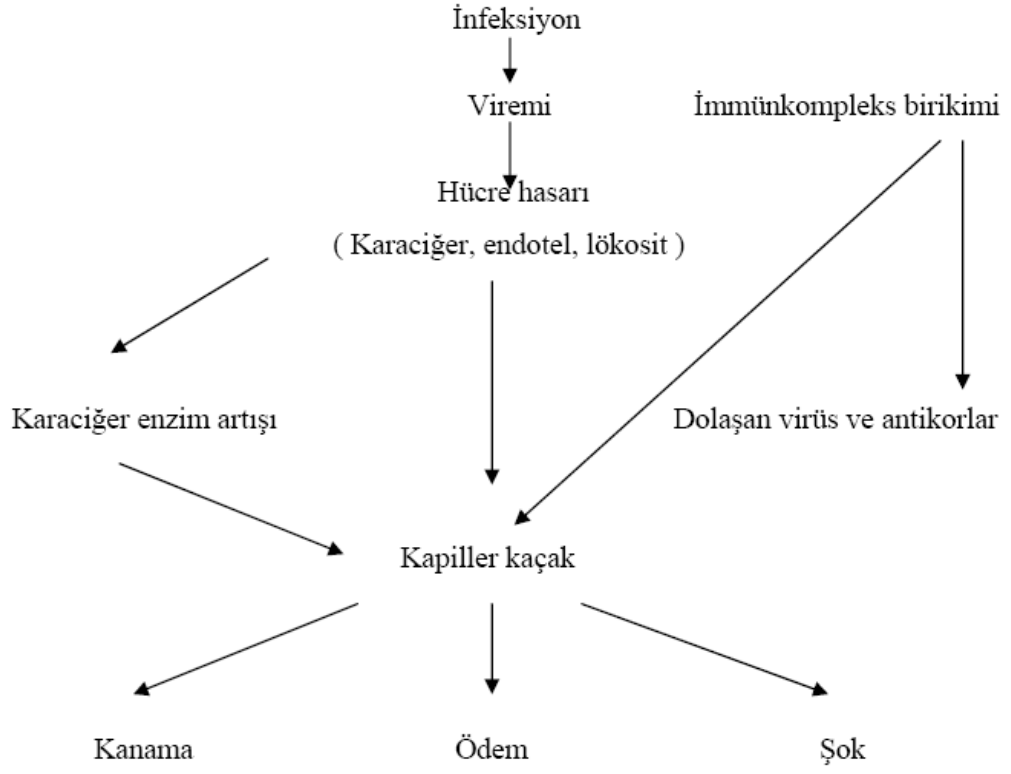
Şekil 9. Viral hemorajik ateş hastalıklarında patogenezi (56)

Virus enfeksiyon giriş bölgesinden bölgesel lenf nodlarını ve dendritik hücreleri enfekte eder. Makrofajlar ve monositler bölgeye ulaşır. Virus ile enfekte olan makrofajlardan ve monositlerden kemokinler salınır. Bu kemokinler makrofajların enfeksiyon bölgesine toplanmasını sağlar. Virus böylelikle enfekte edeceği makrofajların bölgede sayısını artırmış olur, daha sonra makrofajlar sayesinde karaciğer ve dalağa yayılır. Virusların hiçbiri lenfositleri enfekte etmemesine rağmen, lenfositlerin apoptozis ile hızla kaybı hastalığın göze çarpan önemli bir özelliğidir. Enfekte monosit ve makrofajlardan salınan kemokinler lenfositlerin delesyonuna yol açar, proapoptotik proteinlerin artışı dolaylı yoldan sağlar. Endotelial fonksiyon bozuklukları ödeme neden olur.

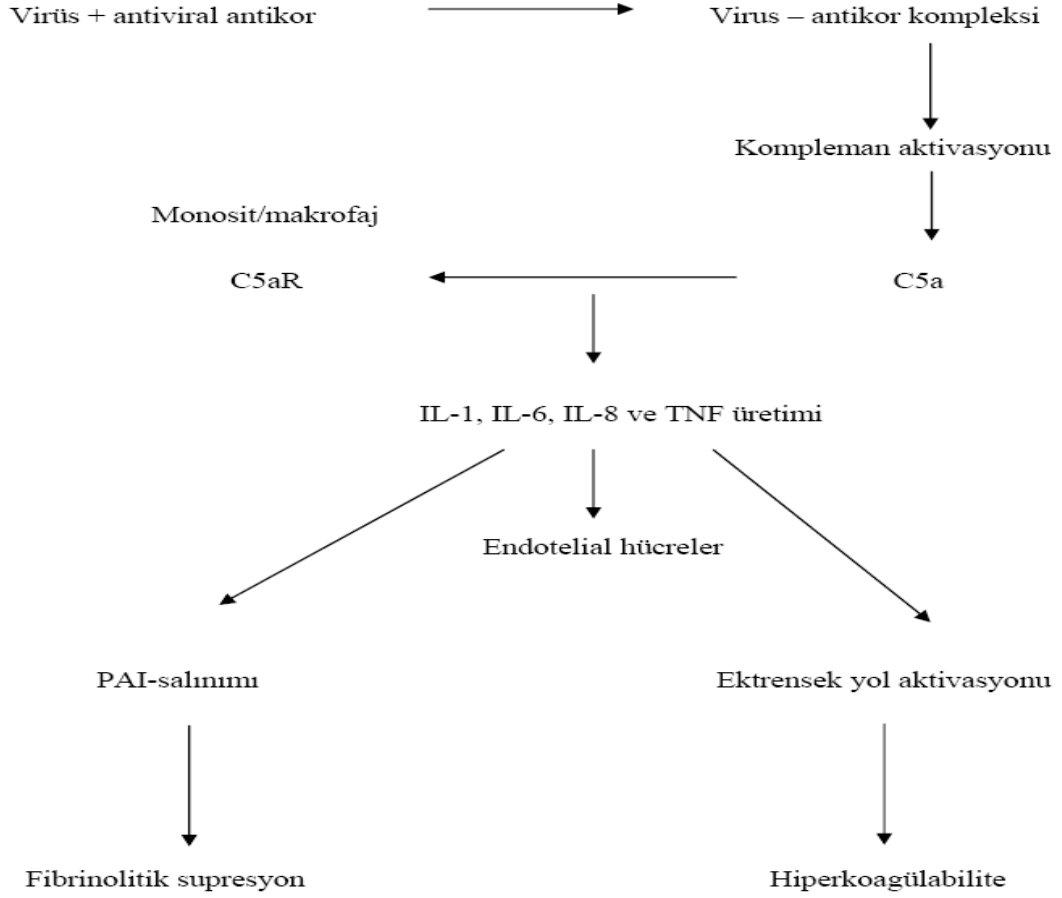
Hepatositlerin ve adrenokortikal hücrelerin enfeksiyonu ile yaygın hemodinamik ve koagülasyon bozuklukları şiddetlenir. Hepatositlerde önemli pıhtılaşma faktörlerinin ve albumin sentezi bozulur. Bu da kanamaya eğilimi artırır, onkotik basıncı azaltır ödem oluşturur. Adrenokortikal hücrelerdeki steroid sentez ve sekresyonunun bozulması hipotansiyona, sodyum azalmasına ve hipovolemiye yol açar (56).

Azalmış trombosit üretimi veya artmış trombosit tüketimi trombositopeniye yol açar ama trombosit disfonksiyonuna yol açmaz.

KKKA hastalığında trombositopeni, DIC, endotel disfonksiyonu, hepatosit disfonksiyonu, koagülasyon faktörleri azalması gözlenir. Kemik iliği incelemesinde megakaryosit azalması ve kemik iliği hipoplazisi gözlenmiştir (57).

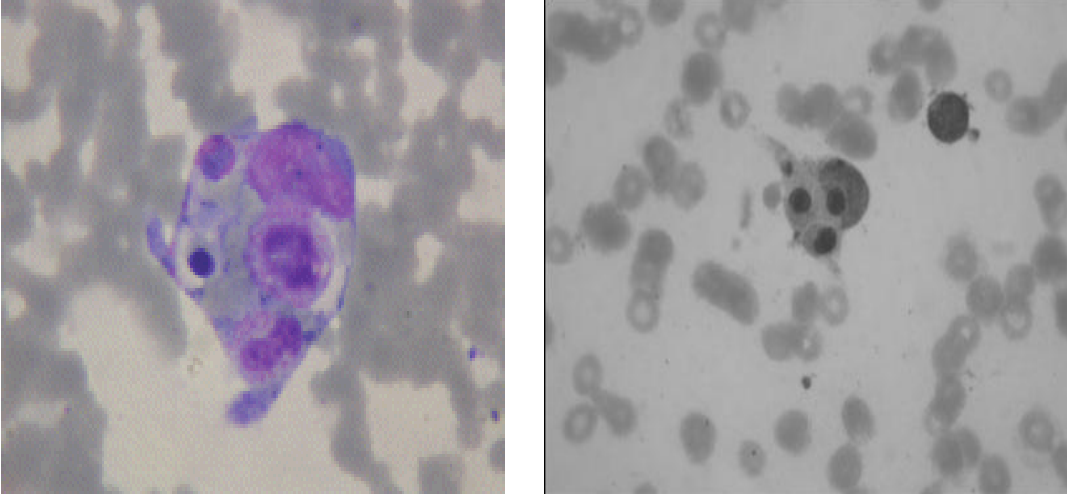


Şekil 10. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi patogenezi (58 nolu kaynaktan).



Şekil 11. Virus-antikor kompleksi oluşumunu takiben koagülasyon ve fibrinolitik aktivasyonu (58 nolu kaynaktan).

Yapılan bazı çalışmalarda KKKA hastalığında hemofagositozun geliştiği gösterilmiştir (Şekil 13). Hemofagositoz mekanizmasında sitokinler önemli bir rol almaktadır. 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 anlamlı yükseklik olduğu gözlenmiştir (59). Çok yüksek seviyedeki gama interferon, TNF, interlökin-1 (IL-1), IL-6 gibi T helper hücrelerinin (Th1) salgıladığı sitokinlerinin hemofagositik lenfositozun immunopatolojik mekanizmasında rolü olduğu bildirilmiştir (59).



Şekil 12. Fagosit edilmiş eritrosit ve trombosit (59 nolu kaynaktan)

2.6.1. İnterferon Sentezi ve KKKA Virusunun İmmun Sistemden Kaçışı

Diğer negatif zincirli RNA viruslarına benzer şekilde önemli miktarda ve dsRNA gibi fazla sinyal üretmez bu nedenle KKKA virusu IFN sentezine karşı koyar. IFN'nin arttığını gösteren çalışma olmamakla birlikte, Kaya (2008)'nin Sivas'ta yaptığı çalışmada hastalarda anlamlı derecede olmayan IFN yüksekliği bulmuştur (60).

2.7. TEŞHİS

KKKA, hastalığın gelişiminin seyrinin hızlı olması ve gelişen immün yanıtın geç oluşması ve nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilmesinden dolayı erken tanısı önemlidir. Hastada kene ısırığı öyküsü, endemik bölgede bulunma veya seyahat öyküsü, hasta insanlar veya hayvanların kan veya dokuları ile temas ve klinik semptomlar (ateş, miyalji, ekimoz, kanama vb) KKKA hastalığının göstergeleridir (14).

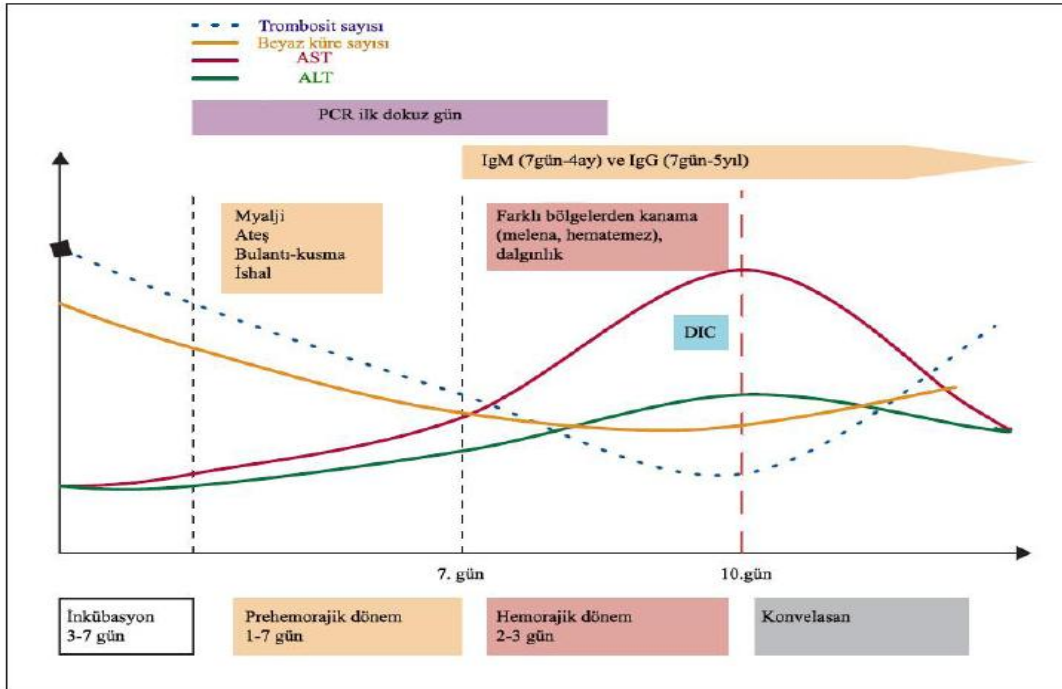
Kanama diatezi bulguları (burun-dışeti kanaması, aşırı vaginal/menstrüal kanama), hematolojik parametrelerinde düşme (trombosit, beyaz küre), biyokimyasal parametrelerde yükselme (ALT, AST, CK, LDH) gözlenmiştir. Ancak hemorajiyeye rağmen pulmoner tutulum ve ensefalit benzeri klinik tablolar ön planda değildir (14). Yapılan kemik iliği aspirasyonunda hemofagositoz görülebilmektedir (11).

Benzer klinik tablo sergileyen hastalıklarla karışabilmektedir: Q Humması, Brucella, Salmonella, diğer VKA hastalıkları (Ebola, Marburg), Vitamin B12 eksikliği, Febril nütropeni. Bu nedenle ayırıcı tanıları yapılmalıdır (14).

2.8. KLİNİK

KKKA enfeksiyonunda klinik seyirde dört ana bölüm görülmektedir. Bunlar: inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelasan dönemdir (14).

Hastaların çoğunda kene ısırmasını takip eden enfeksiyon öyküsü vardır. Kene ısırması ile hastalık bulgularının gelişmesi arasındaki inkübasyon dönemi ortalama 3-7 gündür. Bu süre, enfeksiyonun giriş yolu (kan yolu ile geçişlerde süre daha kısadır) ve viral yüke bağlı olarak değişebilir (10).



Şekil 13: KKKA hastalığının klinik ve laboratuvar seyri (25).

Prehemorajik dönem; 1-7 gün sürer ve baş ağrısı, ani ateş yükselmesi (39-41°C), miyalji, baş dönmesi ile karakterizedir. Ateş 4-5 gün kadar devam edebilir. İshal, bulantı ve kusma diğer bulgulardır. Prehemorajik dönemde vücut üst bölgelerinde hiperemi, konjonktivit görülebilir (10, 14).

Hızlı gelişen hemorajik dönem 2-3 gün kadardır ve genellikle hastalığın 3. ve 5. günlerinde başlar. Hastaların büyük çoğunluğunda hastalığın başlamasından sonra 5-7 gün içinde kanama gelişir. Kanamalar müköz membranlar ve derideki peteşiler ile büyük hematomlar arasında değişir. En sık görülen kanamalar, gastrointestinal sistemden hematemez, melena, intra abdominal, vajinal, üriner sistemden hematüri, burun ve solunum yollarından hemoptizi şeklinde olanlardır (10). Oblik kas, çekum gibi alışılmadık kanamalar da görülebilir, apandisiti taklit eden olgular bildirilmiştir. Kanamanın başlaması ve ateş yüksekliği arasında ilişki yoktur. Hastaların 1/3 ünde karaciğer ve dalak büyüklüğü bildirilmiştir (2).

Hastalığın görülmesinden 10-20 gün sonra konvelesan dönem başlar (10). Relaps hastalığa özgü değildir (10, 58).

2.9. LABORATUVAR TANI METODLARI

Laboratuvar tanı metodları olarak direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır (58). Direkt yöntemler olarak; viral izolasyon, antijen aranması, moleküler yöntemler kullanılır. İndirek yöntemler olarak seroloji, immunfloresan, revers pasif hemaglutinasyon, nötralizasyon yöntemleri kullanılır.

2.9.1. Viral İzolasyon

Emen farelere intrakraniyal inokulasyon yöntemi KKA virusu izolasyonunda kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası virus ile hastalanan fareler 4-6 günde ölürlür (61). Virusun hücre kültürü biyo güvenlik seviye-4 (BSL-4) laboratuvar şartlarında primer tavuk embriyo, embriyonik fibroblast (CF-1), Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero, Vero E6), human Caucasian adrenal cortex adenocarcinoma (SW-13), hibrit böbrek/fibroblast (CER) ve maymun böbrek (LLC-MK2), Madin-Darby köpek böbrek 1 (MDCK-1) epitelyal hücreleri gibi devamlı hücre kültürlerinde de yapılabilmektedir (25). Virusun nükleokapsid proteinlerine karşı monoklonal antikör veya KKA virusu spesifik Mouse Hiperimmun Asidic Fluid (MHIAF) kullanılarak 2-6 günde indirek immunfloresan (IFA) yöntemi ile viral replikasyon tespit edilebilir (62).

2.9.2. Antijen Aranması

Viral antijen aranması ELISA yöntemi veya Reverse Passive Hemagglutination Assay (RPHA) yöntemi ile belirlenebilen, akut enfeksiyonun tespitinde yararlı ve hızlı bir tekniktir (62). ELISA için KKKAV Afrika ve Çin suşlarının nükleoproteinlerine karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar kullanılmıştır (62). ELISA yöntemi ile antijen aranmasının SW-13 hücre kültürü veya RPHA yöntemine göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (62).

Özellikle hastalığın ilk 5 gününde kan ve dokulardan alınan örneklerden virus izolasyonu ve spesifik antijenin tespiti yapılabilir. Özgül antikorlar daha geç ortaya çıktığından, kanda belirlenmeden önce ölen hastalarda immunglobulin tespiti ile tanı konulamayabilir (25).

2.9.3. Moleküler Yöntemler

İnfeksiyon hastalıklarının moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır. Virusun nükleik asitinin amplifikasyon ile çoğaltılması esasına dayalıdır. Çeşitli sayıda nükleik asit amplifikasyon tekniği uygulanmaktadır (63, 64). Günümüzde en pratik olarak ve fazla kullanılan metod ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'dur (13).

PCR birkaç saat içerisinde bir klinik örnekten viral ajanın varlığını ve kantifikasyonuna imkan veren bir metoddur. Spesifik DNA dizilerinin; primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in vitro koşullarda enzimatik olarak amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir ve bu uygulama için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Tanı amaçlı konsensus nükleotid dizileri, S segmentinde nükleoproteinleri kodlayan bölgelerdir, bu segmentin sekans analizleri filogenetik çalışmalara da esas teşkil etmiştir (13).

Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR reaksiyonu; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37°C-65°C aralığında gerçekleştirilen annealing ve 72°C'de gerçekleştirilen elangasyon aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (13). Ortalama 25-40 döngü uygulanır. İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla

birbirinden ayrılır (denatürasyon). Çoğunlukla 94°C- 98°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır (İlk denatürasyon tek döngü olarak 15 dakikaya kadar uygulanır). Denatürasyonu takiben annealing (bağlanma) aşamasında 37°C-65°C arasında oligonükleotid primerler veya proplar, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 30-60 sn'de gerçekleşir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir). Bağlanma aşamasında flouresans ışımaya yapan proplar kullanılarak oluşan kopya ürün sayısınınca ışımaya derecesi artacaktır. TaqMan, Beacons, Scorpions gibi hidrolizasyon propları, Light Cycler gibi hibridizasyon propları veya SYBR Green gibi DNA'ya bağlanan boyalar kullanılmaktadır. Elongasyon (uzama) fazında ise ısı 72°C'ye kadar arttırılır ve Taq polimeraz, DNA polimeraz enzimi gibi tamamlayıcı özelliği ile DNA ipliğini tamamlar. Taq polimeraz giderek inaktive olur, yarı ömrü 92.5'de 130 dk; 95°C'de 40 dk'dir. Bu nedendir ki PCR'in sonlarına doğru olan siklularda aktivitesi sınırlanmaktadır. Taq polimeraz ile DNA zincirinin uzaması sağlanır ve sonunda çeşitli amplifikasyon (ürün) yöntemleri ile oluşan ürünlerin tespiti yapılır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişir. Termal cycler bu üç basamağın her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan nükleik asit miktarı ve döngü sayısına bağlıdır (63).

Çeşitli PCR metodları vardır. Klasik PCR'da hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR çeşididir. Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir. Klasik PCR normalde sayısal (quantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat quantitatife dönüştürülebilir. Jel elektroforezde ürünler karşılaştırılarak veya most probable number (MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır. MNP yönteminde ardarda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır ancak MNP tercih edilmeyen bir yöntemdir. Klasik PCR, düşük maliyet ve az ekipman gerektirmesi, kolay uygulanabilir olması avantajları olmakla birlikte amplifikasyon sonrası analiz gerektirmesi, insan hatası ve kroskontaminasyon riski taşıması, elde edilen ürünün prob hibridizasyonu veya dizileme ile doğrulanması gerektiğinden kullanımı sınırlıdır. Günümüzde işlem sürelerini kısaltmaları, kontaminasyon riskini azaltmaları ve amplifikasyon sayısına bağlı olarak eş zamanlı ışımaların oluşturarak daha özgün ve

doğru sonuçlar verebilmesi nedeniyle Real-Time PCR (RT-PCR) metodları kullanılmaktadır. RT-PCR, klasik PCR metoduna göre 10^7 kat daha güvenilir bir metoddur (63).

RNA molekölü PCR ile çoğaltılmadığından RNA virusunun DNA'ya dönüştürölmesi gerekmektedir. Bunu sağlayan; reverse transcriptase enzimidir. HIV ve Hepatit B viruslarında bulunur. PCR araştırmalarında ise PCR aşamasından önce RNA reverse transcriptase enzimi kullanılarak, komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir ardından DNA, PCR ile çoğaltılmaktadır. Bu amaçla Reverse Transcription PCR yöntemi kullanılır. Bu yöntemde reverse transkriptaz enzimi ve bir DNA primeri gerekmektedir. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) veya bir spesifik primerdir. dT messenger RNA' nın poli A kuyruğuna bağlanır (5' ucunda). dT hexameri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNase inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozunmasıdır. Reverse transcription ve PCR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PCR daha hassas; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır). RT-PCR için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir. Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması, iyon gerekliliği, dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısısı gibi etmenler de önemlidir (63). KKKK virusunun da bir RNA virusu olması nedeniyle genomunun moleköler tespitinde Revers Transcriptase RT-PCR kullanılır. KKKK virus genomu hastalığın başlamasından ilk birkaç günden itibaren klinik örneklerden tespit edilebilir (13, 63).

2.9.4. İndirek Serolojik Yöntemler

KKKAV nükleoprotein antijenine karşı immun yanıt olarak üretilen spesifik IgM ve IgG antikorlarının tespiti esasına dayanır (62, 66). Spesifik IgM antikorlarının tespiti veya ardışık iki kan örneğindeki antikor titresinin 4 kat artışı akut enfeksiyon delilidir (2, 6). Hastalığın bulaşından sonraki birkaç günde IgM tespiti ile tanı konabilir (2, 6). Azalan sensitivitelere göre antikor tespiti için metodlar ELISA, RPHA inhibisyonu, IFA, Floresans Fokus Redüksiyon, Kompleman Fiksasyon,

İmmündefüzyon şeklinde sıralanmıştır (71). Coğrafik orjinleri farklı serotipler arasında floresans fokus nötralizasyon yöntemiyle büyük oranda antijenik homojenite gösterilmiştir (71).

2.9.4.1. ELISA

ELISA yöntemi KKKAV aranması için, RT-PCR ile birlikte, kullanılan en yaygın tekniktir ve IFA'dan daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (16). Antijen kaynağı olarak genelde enfekte emen fare beyninin çeşitli işlemlerle inaktive edilmiş süspansiyonu kullanılmaktadır (18, 61). Rekombinant Nükleoprotein deriveleri de antijen kaynağı olarak kullanılmıştır (65). Rekombinant nükleoprotein (rNP) bazlı yöntemler ile IgG ve IgM immun capture ELISA yöntemi geliştirilmiş ve başarı ile uygulanabilmiştir (66)

KKKAV IgM ve IgG antikorları genellikle semptomların görülmesinden sonraki 4-5. günlerde tespit edilir (2, 6). IgM titreleri hastalığın 2-3 hafta sonrasında en üst düzeydedir ve genellikle 4 ay içerisinde yok olurlar. IgG antikorları birkaç yıl serumda kalıcı olabilir (2, 6). Antijen de ELISA ile tespit edilebilir.

2.9.5. İndirek İmmün Floresan Yöntemi

Hızlı serolojik tanı yapmak için IFA uygun bir yöntemdir (16, 67). Virus ile enfekte hücrelerden hazırlanmış slaytlar hasta serum örnekleri ile muamele edilip floresan izo tiyo siyanad (FİTCH) kullanılarak antikorların tespiti sağlanabilir (68). IgM varlığını gösteren floresans hastalığın en erken dördüncü gününde tespit edilebilir (16).

2.9.6. Revers Pasif Hemaglutinasyon İnhibisyonu

İnfekte emen fare beyninden elde edilen antijenler koyun eritrositlerine gluteraldehit ile fikse edilip KKKAV' ne duyarlı antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir (67, 68).

2.9.7. Nötralizasyon yöntemi

Nairovirusler genellikle bunyavirus ailesinin diğer üyelerinin yaptığından daha zayıf antikor cevabına neden olur, bu nedenle genellikle KKKAV tanısında nötralizasyon yöntemi kullanılmamıştır (68).

2.10. TEDAVİ

KKKA hastalığında temel tedavi destek tedavisidir. Vazopresörler ve ribavirin gereğinde verilebilir. Ciddi hastaların solunum desteği ve mekanik ventilatör gereğinden yoğun bakımda izlenmesi tavsiye edilir. Hematolojik parametreler sıkı takip edilip yerine koyma tedavisi yapılmalıdır. Trombositlerin sayısını ve fonksiyonunu bozabilecek aspirin, nonsteroid antiinflamatuvarlar ve antikoagülanlar kontrendikedir. İntramuskuler enjeksiyonlardan kaçınılmalıdır. Ribavirin tedavisi halen tartışmalıdır. Yan etkisi hemolitik anemi olduğundan bazı klinisyenlerce tercih edilmemektedir veya oral kullanımın yerine parenteral formu tavsiye edilmektedir (69). İnterferonun, immunomodulatorlerin etkinliği ise henüz gösterilememiştir (10, 70). Trombositopenide ise International Normalized Ratio (INR) düzeyinin normalden 1,5 kat artışında taze donmuş plazma verilmelidir (10, 70).

2.11. KORUNMA ve KONTROL

En önemli tedbirler; kenelerden ve endemik kırsal alanlardan uzak durmak, hastaların ve hayvanların kan ve vücut sıvılarının temasından kaçınmaktır. Kene kovucu repellentler; N,N-dietil-metatoluamid (DEET) ve permetrin kullanılabilir. Hastane personeli korunmada rutin önlemler (önlük, eldiven, maske, gözlük vs) almalıdır. Bulaş olmuş yerler ve hastaya kullanılan malzemeler 1:10-1:100 klorlu dezenfektanlar ile temizlenmelidir (15). Henüz aşısı yoktur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA POPULASYONU SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN TEMİNİ

Çalışmaya başlamadan önce Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 05/11/2009 tarih ve 133 nolu kararı ile onayı alınarak, hasta veya yakınlarına çalışmanın amacı ve yapılacak işlemler anlatılıp, yazılı izinleri alındı.

Bu çalışmaya 2010 yılı mart-ağustos ayları arasında Tokat ilinde sağlık kuruluşlarına başvurusunda

- a) Kene ısırığı öyküsü olan
- b) Klinik şikayetleri; ateş, baş ağrısı, myalji/atralji, halsizlik, bulantı, kusma, karın ağrısı olan
- c) Laboratuvar tetkiklerinde; lökopeni, trombositopeni, karaciğer enzimleri; alanin amino transferaz(ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatin kinaz (CK) değerlerinde yükselme görülen
- d) Hemorajik döküntüler, epistaksis, hemoptizi, hematemez- melena gibi kanama diatezleri görülen hastalar, çalışmaya dahil edildi.

Ayrıca kene temas öyküsü olmasa bile nedeni açıklanamayan ateş nedeniyle yatışı yapılan hastalar da KKKA olmadığı teyit edilene kadar çalışmaya dahil edildi.

Her bir hastadan günlük rutin tahliller için alınan kan numuneleri PCR ve ELISA çalışmaları için toplandı ve -85°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Kan örneklerinden KKKA virusunu belirlemek amacı ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonunu takiben reverse transcriptase basamağı ile RNA, cDNA'ya dönüştürüldü ve sonrasında PCR gerçekleştirildi.

Eşzamanlı olarak 40 vakanın, aynı kan örnekleri, viral antijen, IgM, IgG tespiti için immun capture ELISA yöntemi ile analiz edildi.

Hastaların sağlık kuruluşlarında yattığı sürece test edilen hematolojik ve biyokimyasal parametreler ile birlikte yaş, meslek, cinsiyet, ikamet gibi bilgiler kayıt altına alındı.

3.2. ÖRNEKLERİN HAZIRLANIŞI

Hastalardan jelli-düz tüplere alınan 5-10 ml venöz kan ortalama 30 dakika +4°C de bekletildi ve sonra 20 dk 3500 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı. ELISA için vida kapaklı polipropilen tüplere serumlar ayrıldı. Aynı gün çalışılmayan serum örnekleri RNA ekstraksiyon, reverse transcription ve PCR işlemlerine kadar -85°C'de muhafaza edildi.

3.3. REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

Çalışmamızda bir RNA virusu olan KKKA virusunun klinik örneklerden aranması One Step Real Time Revers Transcriptase PCR ile yapıldı. Numunelerden RNA ekstraksiyonu yapıp, bu aşamayı takiben elde edilen RNA'ların daha stabil ve dayanıklı complementer DNA (cDNA)'ya revers transcriptase basamağı ile dönüştürüldü, amplifikasyon basamağında ise DNA'lar çoğaltıldı ve bu esnada oluşan ışımaya düzeyi ölçüldü. Kullandığımız kit KKKA virusunun S segmentini hedeflemektedir. Numunelerden viral RNA ekstraksiyonu (izolasyon) sonrasında revers transkripsiyon ve amplifikasyon işlemleri RT-PCR cihazında tek safhada gerçekleştirilmiştir (One Step Real Time PCR).

Moleküler çalışmalar GOÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na bağlı PCR laboratuvarında yapıldı. Reagent hazırlama, örnek hazırlama ve PCR amplifikasyon olarak üç kısımdan oluşan temiz oda adı verilen bölümde gerçekleştirdik. Örnek hazırlama odasında ayrıca hepafiltreli laminer bio güvenlik kabini bulunmaktadır. Bölümler, içinde ultraviyole lambalarının bulunduğu transfer penceresi ile birbirine bağlantılıdır. Ayrıca bütün odalarda da ultraviyole lambalar bulunmaktadır. Havalandırmaları birinci ve ikinci odada negatiften pozitif doğru bir akım varken üçüncü odada pozitiften negatife doğru bir hava akımı vardır.

3.3.1. Yöntemin Prensibi

Üç ana işleme dayanmaktadır:

- Örneklerden CCHFV RNA izolasyonu
- RNA'nın revers transkripsiyonu ve cDNA'nın amplifikasyonu
- Çoğaltılan ürünlerin belirlenmesi

İzolasyonda CCHFV izolasyon kiti (Astra, Hamburg, Almanya) , diğer iki safha için yine aynı firmanın CCHFV Real Time PCR Detection kiti kullanıldı. Kullanılan kitin kalitatif sonuç veren PCR kiti olması nedeniyle izolasyon sonrasındaki işlemler tek safhada PCR cihazında yapıldı.

3.3.2. Bulunan Materyaller

Bölüm 1: Klinik örneklerden RNA izolasyonu; Biorobot EZ1 cihazında gerçekleştirildi.

Bölüm 2: - RNA'nın revers transkripsiyonu

-cDNA'nın amplifikasyonu

-Çoğaltılan ürünlerin belirlenmesi; Corbett Research RG6000 cihazında gerçekleştirildi.

3.3.3. RNA Elde Edilişi

- Alınan numuneler 3500 rpm 15 dk santifiruj edildi.
- Numunenin üst kısmında kalan serumdan 400 mikrolitre alındı.
- İzolasyon kiti bulunan Biorobot EZ1 cihazına konarak RNA izolasyonu yapıldı.

Biorobot EZ1 Otomatik İzolasyon Prosedürü

1. Kartuşlar vortekslendi ve ok yönünde yerlerine yerleştirildi. 2 ml'lik tüpleri kapakları açık olarak kartuşlara yerleştirildi.
2. Cihazın rackına tüpler ve tip, tip holderları yerleştirildi.
3. 1,5 mililitrelik eppendorf tüpüne izolasyon mixi (bir numune için; 3,6 µl cRNA, 49,2 µl bufferAVE, 7,2 µl internal kontrol) hazırlanıp dağıtıldı.
4. Karışım vortekslenip, santrifüj edildi. Her bir 1,5 ml.lik tüpe 60 µl dağıtıldı.
5. Cihaza sıralarına göre yerleştirildi.
6. Serumları vorteksleyip santrifüjledikten sonra 2 ml.lik tüplere 400 µl dağıtıldı.

4							4>Örnekler-> 2ml lik tüplere.
3							3>C.RNA + int.kontrol+b.AVE karışımı
2							2>Tipholder,içine tipler
1							1>Boş 1,5 ml. tüpler

7. Cihaz kapağı kapatılıp ve çalıştırıldı. Yaklaşık 45 dakika işlemde tutuldu.

3.3.4. Revers Transcription ve Amplifikasyon:

Bu iki safha da “*Corbett Research RG 6000*” One Step RT-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

1. PCR aşaması için CCHFV Real Time PCR Detection Kit Master Mix (her bir numune için master mix A 5 µl, master mix B 10 µl) hazırlandı.
2. Standardizasyon amacıyla 1 pozitif kontrol, 1 negatif kontrol için olmak üzere “numune sayısı+2” sayıda 0,2 ml lik tüpler ağzı açık olarak dizildi.
3. Her bir tüpe 15 µl. mix dağıtıldı.
4. Üstlerine eksrakte edilen RNA numunelerinden 10 µl eklendi, vortekslendi ve kapatıldı.
5. Son 2 tüpe; pozitif kontrolden 10 µl koyuldu. Negatif kontrol olarak 10 µl distile su koyuldu.
6. Corbett Research RG 6000 cihazı, CCHFV programında yaklaşık 2 saatte işlemi sonlandırdı.
7. Oluşan amplifikasyon ürünlerinin siklularda verdiği ışımının eşik değerleri (threshold) monitorize edilerek sonuç kalitatif olarak değerlendirildi.

3.3.5. Sonuçların Analizi

Taqman yöntemi kullandığımız RT-PCR sayesinde flouresans ışımaya sinyal artışı PCR ürün artışı ile doğru orantılı olduğundan başlangıçtan itibaren PCR döngüsündeki üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı olarak izlenebilmektedir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşmaktadır. İşte bu flouresans ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısına; Cycle Threshold (Ct) denir. Corbett Research RG 6000 cihazı CCHFV programında yaklaşık 2 saatlik işlem sonucunda Taqman yöntemi ile çoğaltılan RNA'larının yaptıkları ışımaların eşik değere göre (Cycle threshold) üzerinde olanlar kalitatif (pozitif) olarak değerlendirildi. Bu pozitifliğin kaçınıcı siklusta oluştuğu da cihaz tarafından çizilen grafikte belirlendi. Başlangıçta viral yükü fazla ise PCR esnasında amplifikasyon artışına neden olacak ve Ct değeri düşecektir. Eğer bir numunenin Ct değeri 40 veya daha yüksekse, amplifikasyonun oluşmadığını gösterir. Çalışmanın doğru çalıştığını teyit amacıyla pozitif ve negatif kontrol numuneleri internal kontrollerle birlikte çalışıldı. Pozitif kontrol ve internal kontrolün her ikisinin de eşik değer üzerinde eğri çizmesi çalışılan kitin doğru çalıştığını teyit etmektedir.

3.4. ELISA

KKKA spesifik Antijeni (Ag), IgM, IgG antikorları immun capture ELISA yöntemi ile çalışıldı. Test kiti olarak Vector-Best Laboratories (Koltsovo, Russia) kitleri kullanıldı. Spesifik antijen ve antikor ile kaplı mikroplaterler üretici firmanın uygulama talimatına göre ELISA cihazında (Triturus, Grifols) yarı otomatik olarak işlemlerden geçirildi ve 450 nm ve 620 nm dalga boyunda ölçülerek optik dansite olarak ifade edildi.

3.4.1. Yöntem

1) A1 kuyucuğu kör kontrol olarak, B1 ve C1 negatif kontrol, D1 ise pozitif kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı ve kontrol solusyonları ilave edildi. Geri kalan kuyucuklara ise çalışılacak hastaların serumları dağıtıldı.

- 2) 37°C'de 60 dakika inkübasyon.
- 3) Yıkama işlemi, 5 kez yapıldı.
- 4) Tüm kuyucuklara konjugat ilave edildi.
- 5) 37°C'de 60 dakika inkübasyon.

- 6) Yıkama işlemi, 5 kez yapıldı.
- 7) Tüm kuyucuklara TMB solusyonu ilave edildi.
- 8) Karanlıkta 22°C’de 25 dakika inkübasyon.
- 9) Stop solüsyonu konuldu.
- 10) 450 ve 625 nanometrede spektrofotometrik olarak okutuldu, sonuçlar optik dansite olarak değerlendirildi.

3.4.2. Sonuçların Analizi

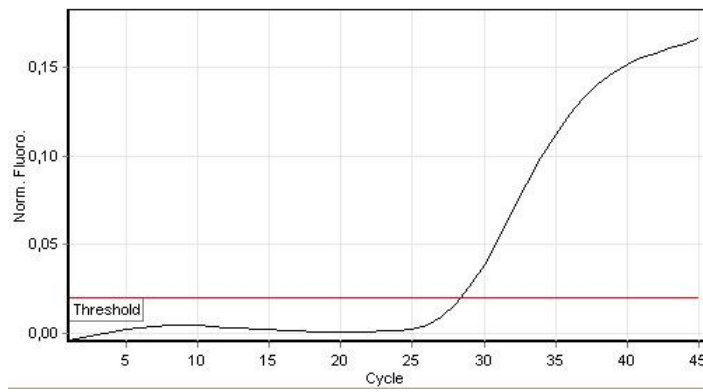
Her test için bir cut-off değeri hesaplandı ($OD_{cut-off} = OD_{neg.ort.} + 0,2$). Buna göre cut-off değerinin 0,9 katından daha düşük ve eşit seviyede olanlar negatif olarak değerlendirildi. Cut-off değerinin 1,1 katından daha yüksek ve eşit seviyede olanlar ise pozitif olarak değerlendirildi.

3.5. SONUÇLARIN ANALİZİ VE YORUMLANMASI

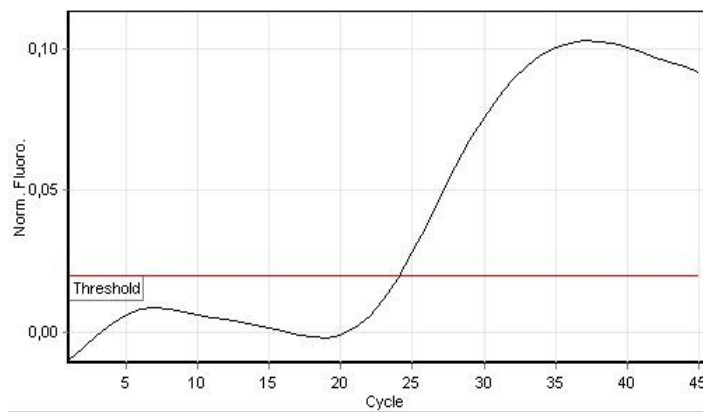
3.5.1. RT-PCR SONUÇLARI

Çalışmamızda kullandığımız kitin doğruluğunu teyit etmek için kullanılacak numunelerle birlikte pozitif kontrol ve internal kontrol de çalışıldı. Threshold çizgisine göre çizdikleri flouresans ışıma eğrileri aşağıdaki grafikler şeklinde olmuştur (Şekil 13 ve 14).

Pozitif kontrol



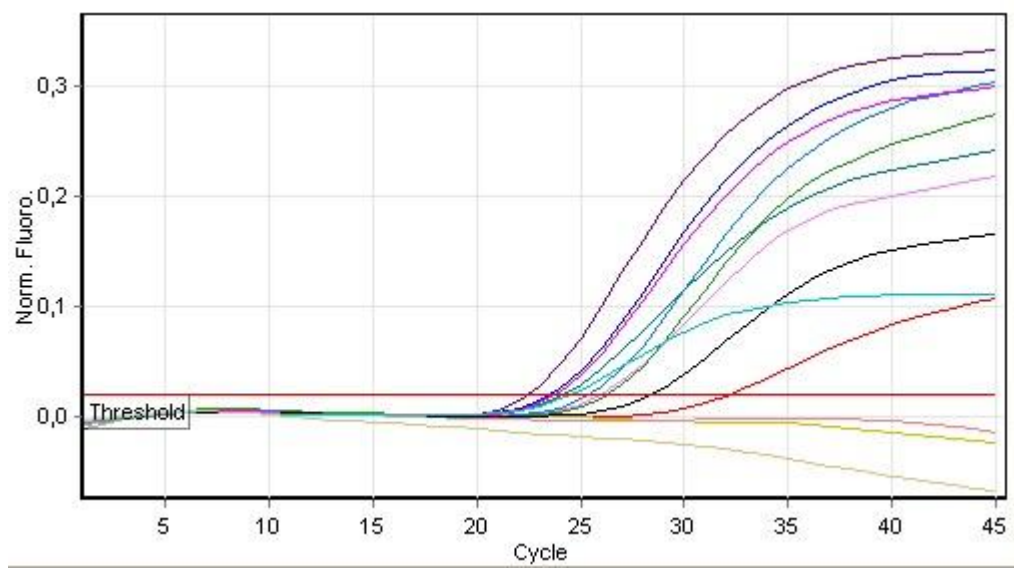
İnternal kontrol



Şekil 14-15: RT-PCR amplifikasyonunda pozitif ve internal kontrol ışıma eğrileri

Buna göre RT-PCR metodunda kullandığımız pozitif kontrol ve internal kontrollerin her ikisi de yaklaşık 25-30. siklusta threshold çizgisini geçerek ışıma vermeye başladı ve artarak devam etti. Bu da bize kullandığımız kitin doğru çalıştığını göstermiş oldu.

Buna dayalı olarak numunelerin verdiği ışımaya eğrileri aşağıdaki gibi sonuçlanmıştır (Şekil 15 ve 16).



No.	Colour	Name	Type	Ct
1	Red	37 A. Y. GİRİŞ	Unknown	32,10
2	Yellow	38 E. Ç. ÇIKIŞ	Unknown	
3	Blue	44S. B. 03,05,10	Unknown	23,55
4	Purple	45 H. Ç. 25,04,10	Unknown	22,46
5	Pink	46 H. G. GİRİŞ	Unknown	25,92
6	Light Blue	47 S. E. GİRİŞ	Unknown	25,37
7	Teal	48 H. Ş. 14,05,10	Unknown	24,07
8	Light Red	49 S. K. 18,05,10	Unknown	
9	Green	50 B. K. 24,05,10	Unknown	26,24
10	Magenta	51 A. Y. ÇIKIŞ	Unknown	23,76
11	Black	52 E. Ç. GİRİŞ	Unknown	28,38
12	Cyan	POZ. KONTROL	Positive Control	24,50
13	Olive	NEG.KONTROL	Negative Control	

Şekil 16-17: Numunelerin oluşturduğu ışımaya eğrileri ve sonuçları.

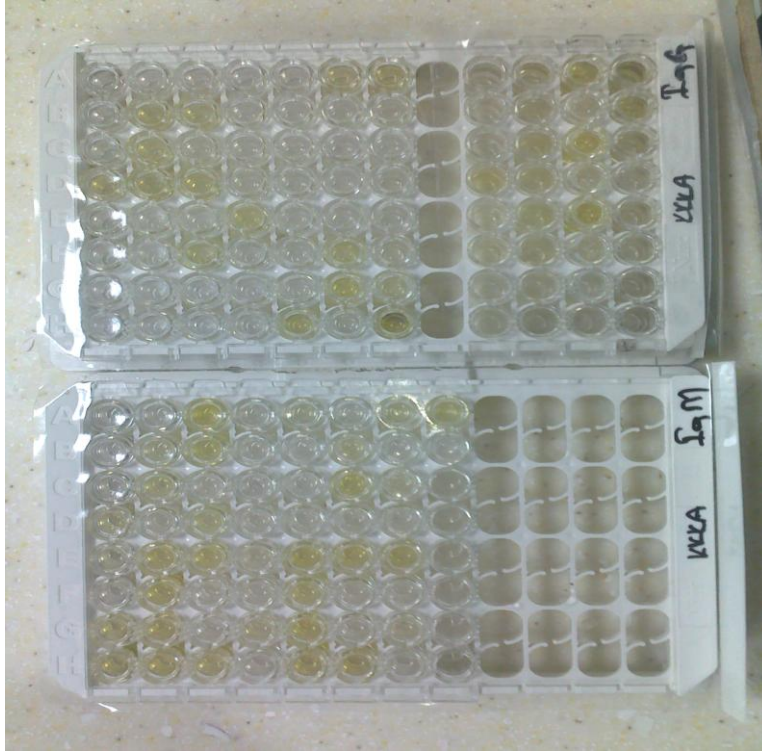
Cihazda her hasta için ayrı bir renk seçildi ve bu renk ayırımından faydalanarak eğrilerin kime ait olduğu ve ışımada threshold çizgisini kestiği Ct değeri grafiksel olarak belirlenebilmiştir. Ayrıca bu grafiksel veriler sayısal olarak da belirtilmiştir. Buna göre; 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11. numuneler viral yük olarak pozitif bulunmuştur. 3 ve 4 nolu numuneler en erken flouresans veren, 1 nolu numune en geç flouresans veren numunedir. 2 ve 8 nolu numuneler ise threshold çizgisini aşacak ışımayı verememiştir ve negatif sonuçlanmıştır. Bu durumda 3 ve 4 nolu numunelerin başlangıç viral yükleri diğerlerinden yüksektir.

Çalışmadaki tüm numuneler değerlendirildiğinde 40 hastanın 38'ini pozitif, 2'sini negatif olarak tespit ettik ve bu sonuçlar aynı numunelerle Hıfzısıhha Başkanlığı'nda elde edilen sonuçlarla nerdeyse tamamen örtüşmekteydi.

3.5.2. ELISA SONUÇLARI

İmmun capture yöntemi ile yapılan ELISA testlerimizde antijen aranmasını genellikle ilk beş güne ait kan numunelerinde, IgM ve IgG aranmasını ise ilk günden taburcu olunan güne kadar olan kan numunelerinde araştırdık.

ELISA testlerini her birinde sekiz çukurcuk bulunan on iki stripli mikropate çerçevelerde yaptık. Antijen araması için immunglobulinlerle kaplı stripler, immunglobulin M ve G araması için de antijenle kaplanmış stripler kullanıldı. Spesifik antijen ve antikor ile kaplı mikropateler üretici firmanın uygulama talimatına göre ELISA cihazında (Triturus, Grifols) yarı otomatik olarak serolojik işlemlerden geçirildi ve oluşan kromojenite optik dansite olarak 450 nm ve 620 nm dalga boyunda ölçüldü. İlk dört kuyucuk kitin doğru çalıştığını göstermek için kalite kontrol amaçlı kullanıldı. Kör ve negatif kontrol kuyucuklarının optik dansitelerinin 0,1'in altında olması ve pozitif kontrol kuyucuğunun optik dansitesinin 1,0'ın üzerinde olması gerekiyordu. Çalışma sonuçlarımız da benzer şekilde oldu. Buradan "ODcut-off= ODneg.ort.+0,2" şeklinde cut-off hesaplaması yapıldı. IgM için cut-off değerinin 0,9 katından (IgG ve antijen için 0,8 katı) daha düşük veya eşit olanlar negatif olarak, 1,1 katından daha yüksek ve eşit seviyede olanlar ise pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kuyucuklardaki renklenme makroskobik olarak görülüyordu (Şekil 18).



Şekil 18: ELISA yönteminde kullanılan mikroplateler.

KKKA IgG								
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Kör 0.020	S5 0.033	S13 0.033	S21 0.030	S29 0.023	S37 1.212	S45 1.909	
B	CO1 0.030	S7 4.854	S15 1.671	S23 0.021	S31 0.021	S39 0.034	S47 0.064	
C	CO1 0.024	S6 1.527	S14 0.036	S22 0.019	S30 0.087	S38 0.027	S46 0.032	
D	CO2 2.174	S8 4.838	S16 2.047	S24 0.100	S32 0.021	S40 0.037	S48 0.088	
E	S1 0.083	S9 0.028	S17 0.024	S25 0.894	S33 0.025	S41 0.032	S69 0.045	
F	S3 0.052	S11 0.042	S19 3.537	S27 0.029	S35 0.031	S43 0.999	S56 0.142	
G	S2 0.034	S10 0.021	S18 0.021	S26 0.020	S34 0.027	S42 0.901	S70 0.335	
H	S4 0.035	S12 0.061	S20 0.025	S28 0.026	S36 4.835	S44 0.025	S73 4.760	

Tablo 3: Çalışmadaki ELISA sonuçlarının optik dansite değerleri.

“Cut-off = CO1ort + 0,2” => Cut-off değeri= 0,207.

Bu değerin 0,8 katından düşük olanlar negatif olarak sonuçlandı. Görüldüğü üzere D1 pozitif kontrol, S6, S7, S8, S15, S16, S19, S25, S36, S37, S42, S43, S45, S70, S73 nolu kuyucuklar pozitif kabul edildi.

Kitlerimizin sınırlı sayıda olması sebebiyle her hasta için antijen aramasını en fazla iki farklı günde, IgM aramasını en fazla üç farklı günde, IgG aramasını ise en fazla beş farklı günde yaptık. Antijen ve immunglobulinlerin kaçınıcı günde pozitif bulunduğu kaydedildi.

PCR pozitif olanlardan 9 hastada antijen pozitifliğini (ortalama 3. günde), 36 hastada IgM pozitifliğini (ortalama 5. günde), 18 hastada IgG pozitifliğini (ortalama 8. günde) tespit ettik. PCR negatif hastalardan birinde ise 3. günde IgM pozitifliğini tespit ettik ki, bu durum Hıfzısıhha Başkanlığı’nda elde edilen sonuçlarla aynıydı.

Ayırıcı tanıda Brucella hastalığı için serolojik olarak Rose Bengal testi uygulandı ve pozitif olanlara Wright tüp aglutinasyon testi yapıldı. PCR’ı pozitif olan bir hastanın Rose Bengal testi pozitif olup aglutinasyon testi titrasyonu 1/320 olarak bulundu.

3.6. HEMOGRAM VE KOAGULASYON TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI

Hemogram testleri BECKMAN COULTER Gen S System cihazı ve Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, 111. USA) cihazında çalışılmıştır. Bu cihazlarda hemogram parametrelerindeki değişiklikler incelendi. Özellikle de hemoglobin, lökosit, trombosit düzeylerindeki değişiklikler dikkate alındı. Lökosit sayısı normal değerleri 4.000-10.000/mm³ olarak kabul edildi. Lökosit sayısı <4.000/mm³ ise lökopeni, >10.000/mm³ ise lökositoz olarak kabul edildi. Trombosit sayısı 150.000-400.000/mm³ olarak belirlendi ve yatışta 150.000/mm³ altındaki değerler trombositopeni olarak kabul edildi ancak genel durum iyiliği ile birlikte trombosit sayısı 100.000/mm³’e kadar yükseliş gösteren hastaların taburcu olmasında klinisyenlerce mahsur görülmedi.

Koagulasyon testleri ise Ceveron Alpha ve STA Compoct cihazında çalışıldı. PT, PTT, INR, Fibrinojen ölçümleri yapıldı. PT için normal değerler % 70-130, PTT için 20-45 saniye, INR için 0,8-1,2, Fibrinojen için 1,5-4,5 g/L olarak tespit edildi.

3.7. RUTİN BİOKİMYASAL TESTLERİN ÇALIŞILMASI

Hastaların serumlarının rutin biyokimyasal testleri BECKMAN COULTER Synchron Clinical System metodlu UniCell Dx 800 cihazı ve Dimension® Clinical Chemistry System metodlu DADE BEHRİNG RxL Max(Dade Behring Inc. Newark, DE 19714, USA) cihazında çalışılmıştır. Özellikle ALT, AST, GGT, LDH, CK-MB, CK enzim değerlerindeki değişiklikler dikkatle incelendi. Erişkinler için normal değerler; ALT ve AST 10-40 IU/L, GGT 7-50 IU/L, LDH 98-192 IU/L, CK 49-397 IU/L, CK-MB 2-19 U/L olarak kabul edildi.

3.8. ARAŞTIRMA VERİLERİNİN ANALİZİ

Çalışma verilerinin analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) V.18 paket programı kullanılarak bilgisayar ortamında yapılmıştır. Bu programda çalışmaya alınan hastaların yaşı, ikameti, meslek, yatış ve taburcu tarihi, kene teması, hemogram, koagulasyon ve biokimyasal testlerinin sonuçları, PCR ve ELISA testlerinin yapıldığı tarihler ve sonuçları, çıkan sonuçların hastalığın seyri ve laboratuvar tetkik değerlerine olan etkileri veri olarak aktarıldı ve irdelendi. PCR standart test olarak kabul edildiğinde ELISA yönteminin sensitivite değeri hesaplanmıştır. Her iki yöntemin etkinlikleri arasındaki eşleşme için Cramer's V testi kullanıldı, immunglobulinlerin lökosit ve trombositlere olan katkısının anlamlılığını belirlemek için Spearman testi kullanıldı. Ancak örneklem sayımızın 40 olması, verimli bir istatistiksel değerlendirme için engel teşkil etmektedir. Bu yüzden verimli bir istatistiksel değerlendirme yapabilmek için örneklem sayısının fazla olduğu ileri çalışmalar gerekmektedir.

4. BULGULAR

İncelemesi yapılan toplam 40 hastanın ilk gün alınan kan örneklerinde One Step RT-PCR cihazı ile yaptığımız ilk moleküler incelemede 37 numune pozitif olarak bulundu. İnkubasyon periodu göz önüne alınarak, negatif bulduğumuz 3 hastanın dördüncü ve sonraki günlerdeki numuneleri de işleme alındı. PCR sonucu negatif olan hastalardan biri pozitifleşti. Bu hasta kene ısırması sebebiyle ilk başvurusunda genel muayenesi ve tahlillerinin normal değerlerde çıkması nedeniyle yatırılmamıştı ve ilk başvuru kanıyla yapılan PCR sonucu negatifti. Ancak üç gün sonra KKKA hastalığı bulguları nedeniyle yatırıldı ve bu dönemde yapılan PCR çalışması pozitif bulundu (ilk başvurudan sonraki altıncı günde).

İlk PCR sonucu pozitif olup IgM’i ilk 5 günde pozitifleşen beş hastanın 3-9. günlerde tekrarlanan PCR sonucu ise gelişen immün yanıtı bağli olarak negatifleşti.

Klinik bulgularının ve tahlillerinin KKKA hastalığı ile uyumlu olduğu, ilk gün PCR sonucu negatif çıkan bir hastanın daha sonraki PCR sonucu da negatif olmakla birlikte yatışının üçüncü gününden itibaren IgM pozitif bulundu (Tablo 4).

İmmün capture yöntemi ile yapılan ELISA testlerimizde antijen aranmasını genellikle ilk beş güne ait kan numunelerinde, IgM ve IgG aranmasını ise ilk günden taburcu olunan güne kadar olan kan numunelerinde araştırdık. Kitlerimizin sınırlı sayıda olması sebebiyle her hasta için antijen aramasını en fazla iki farklı günde, IgM aramasını en fazla üç farklı günde, IgG aranmasını ise en fazla beş farklı günde yaptık. Bu kısıtlılığa rağmen antijen pozitifliğini 9 hastada tespit ettik (ortalama 3. günde). IgM pozitifliğini 36 hastada (ortalama 5. günde), IgG pozitifliğini 18 hastada (ortalama 8. günde) tespit ettik (Tablo 4). Bu çalışmaya dahil olmamakla birlikte ölen üç vakanın ilk gün kanlarıyla yaptığımız testlerde hepsinde antijen pozitif iken immunglobulinler negatif idi.

4.1. ÖLÜM ORANLARI

Çalışmamızdaki hastalara ribavirin tedavisi uygulanmamakla birlikte ölüm vakası da olmamıştır. 2010 yılı itibariyle Tokat'tan KKKA hastalığı nedeniyle ölen vaka sayısı 6 olmuştur ama bunların hepsi Tokat ili dışındaki hastanelere sevk edilen ve oralarda hayatını kaybeden vakalardır. Sadece 3 vakanın ilk gün kan numuneleri elimizde olduğundan, kayıtları envanterimizde olmakla birlikte çalışmaya dahil edemedik.

4.2. SOSYO-DEMOGRAFİK DEĞİŞKENLER

Çalışmamızda yer alan vakaların bazı sosyo-demografik değişkenlere göre dağılımı tablo-14'de gösterilmiştir.

Vakaların 23'si erkek, 17'i bayan idi. Yaş ortalamaları 45,4 idi. Tamamında (biri hariç) meslek; hayvancılık ve tarım olarak belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4: Vakaların Sosyo-Demografik Değişkenlere Göre Dağılımı.

	PCR (-) Vakalar		PCR(+) Vakalar		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Cinsiyet						
Erkek	2	5	21	52,5	23	57,5
Kadın	-		17	47,5	17	42,5
Yaş grupları						
≤29	-		10	25	10	25
30-39	-		5	12,5	5	12,5
40-49	-		6	15	6	15
50-59	1	2,5	5	12,5	6	15
60≥	1	2,5	12	30	13	32,5
Ortalama yaş					45,4	
Meslek						
Tarım-hayvancılık	2	5	37	92,5	39	97,5
Diğer	-		1	2,5	1	2,5

4.3. ÖYKÜ- RİSK FAKTÖRLERİ

Hastalık öyküsünde endemik kırsal kesimde yaşama, tarım ve hayvancılıkla uğraşma ve kene teması en önemli faktörler idi. Bu faktörlerden ilk ikisi her hastada mevcut iken kene teması öyküsü bilinen vaka sayısı 32 idi. Geriye kalanlar ise kene teması olmadığını veya hatırlamadığını belirtti. Bir vaka ise bir gün önce Tokat'a geldiğini ve ertesi gün rahatsızlandığını belirtti (Tablo 5).

Tablo 5: Vakaların öykü-risk faktörlerinin dağılımı

	PCR (-) Vakalar	PCR(+) Vakalar	Toplam	%
Kene ısırığı mevcut	1	31	32	80
Kene ısırığı yok	1	7	8	20
Kırsal alanda yaşam var	2	37	39	97,5
Hayvancılık ve tarım var	2	37	39	97,5
Seyahat öyküsü	-	1	1	2,5

4.4. HEMATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

Tüm hastalarda (PCR pozitif ve negatif olan) trombositopeni, lökopeni ve ALT, AST, LDH, CK, LDH enzimleri yüksekliği dikkat çekmektedir. Buna rağmen gerek ilk başvuruda gerekse ilerideki günlerde hemoglobin, hematokrit değerleri ve koagülasyon testlerinde, serolojik testlerinde kayda değer bir değişiklik gözlenmedi.

Çoğu hastada lökosit sayısında IgM'nin ortaya çıkışı ile, trombosit sayısında ise IgG'nin ortaya çıkışı ile nispeten bir alaka gözlemledik. IgM pozitifleştiğinde lökosit sayısındaki azalma durmakta ve ertesinde yükselişe geçmekteydi. IgG pozitifleştiğinde trombosit sayısında azalma durmakta ve yükselişe geçmekteydi.

Enzimlerin yükseklikleri her hasta için farklıydı ama prognozu etkileyecek bir durum arz etmediler. Kısmi yüksekliklere rağmen bile genel durum iyiliği, lökosit ve trombosit düzeyleri normalleşen hastalar klinisyenlerce taburcu edildi ve bir hafta sonra kontrole çağrıldı.

Serolojik olarak sadece PCR sonucu pozitif bir hastada Brucella pozitifliği de (Rose-Bengal testi pozitif, aglutinasyon titresi 1/320) tespit edildi.

4.5. PCR VE ELISA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRMASI

Hastalarımızın hepsinde PCR ve ELISA yöntemi kullanılmıştır. Toplam 40 hastanın 38'inde PCR pozitifliği, 9'unda antijen pozitifliği, 36'sında IgM pozitifliği, 18'inde IgG pozitifliği (4 hastanın 10. günden sonra pozitifleşti) tespit edildi. PCR negatif bir hastanın IgM'i pozitif bulundu (Tablo 6).

Tablo 6: PCR ve ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması

	PCR (+)	PCR (-)	TOPLAM
Antigen (+)	9	-	9
IgM (+)	35	1	36
IgG (+)	18	-	18

PCR'ı standart yöntem olarak kabul ederek, Tablo-6'ya göre ELISA yöntemi ile en fazla pozitiflik tespit edilen IgM için hesaplanan Sensitivite: % 94,7'dir.

Her iki yöntemle kaydedilen sonuçlar incelendiğinde RT-PCR yöntemi hastalığın tanısında en erken ve en fazla pozitifliği tespit edebilen yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (% 95, ilk 5 günde). Ancak IgM'in pozitiflik oranı RT-PCR'la tespit edilen orana yakındır (% 90, ortalama 5. günde). Antijen pozitifliği az sayıda olmakla birlikte ilk günden itibaren tespit edilebildi ve beraberinde mutlaka PCR da pozitif bulundu. IgG ise 3. günden itibaren (ortalama 8. günde) tespit edilebilmiştir (Tablo 7). Ancak IgG ortaya çıkması hastalığın seyrinde özellikle trombosit sayısında anlamlı artışa neden olmaktadır (Spearman testi, korelasyon: 0,708).

Tablo 7: PCR ve ELISA pozitiflik sayılarının günlere göre dağılımı

Günler	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	10 >	Ortalama
PCR (+)	15	14	5	2	2	-	-	-	-	-	-	2. gün
IgM (+)	-	3	5	7	9	8	2	2	-	-	-	5. gün
IgG (+)	-	-	1	-	3	2	3	2	1	2	4	8. gün
Antijen (+)	3	-	2	1	1	1	-	1	-	-	-	3. gün

*10> : 10.günden sonraki günler.

5. TARTIŞMA

KKKA hastalığının akut gelişen, morbiditesi ve mortalitesi yüksek olan bir hastalık olması erken teşhisi gerekli kılmaktadır. Bu nedenle erken teşhisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Virus izolasyonu kan veya doku örneklerinden hastalığın ilk 5 gününde LLC-MK2, Vero, BHK-21 ve SW-13 hücre serilerinde yapılabilmele birlikte, biyogüvenlik düzeyi-4 laboratuvarı gerektirdiğinden ülkemizin de içinde yer aldığı birçok endemik ülkede bu yöntem uygulanamamaktadır (35, 71). Viral antijen tespiti ise, kan ve doku örneklerinde direkt immunfloresan antikor veya ELISA yöntemiyle yapılabilir (35). Ölümcül seyreden olgularda ve genellikle hastalığın ilk birkaç gününde saptanabilir düzeyde antikor yanıtı gelişmeyebilmekte ve bu dönemde tanı, kan veya doku örneklerinden PCR ve antijen tespiti ile konulabilmektedir (25).

Viremi dönemi oldukça kısa olan KKKA olgularda, hastalığın başlangıcında henüz özgül antikorlar gelişmediğinden tanı için nükleik asit amplifikasyon teknikleri özellikle Real Time Revers Transcriptase PCR yöntemi tercih edilmektedir (25). Moleküler ve ELISA yöntemleri şu anda erken tanıda en pratik kullanılabilen yöntemlerdir. Kene teması gibi durumlarda ilk günlerde klinik ve laboratuvar hiçbir bulgu saptanamadığı durumlarda erken tanı yöntemleri önem kazanmaktadır. Real Time PCR, günümüzde daha hassas sonuç vermesi ve kısa zamanda sonuçlanması sebebiyle PCR çeşitleri arasında, tercih edilmektedir. Teknik sebeplerle veya numunenin viremi oluşmadan önceki dönemde alınması yalancı negatifliklere neden olabilmekte bu sebeple ELISA yöntemi ile antijen, IgM, IgG aranması da tanıda büyük yarar sağlayacaktır.

Uyguladığımız One Step Real Time Revers Transcriptase PCR yöntemi ile çalışmamızda incelemeye aldığımız 40 hasta serum örneğinden 38'ini (% 95) pozitif, 2'sini negatif tespit ettik, Özdemir (2009) çalışmasında ise Jel Elektroforez Revers Transcriptase PCR ile % 60 pozitiflik tespit edebilmiştir (74).

RT-PCR pozitifliği ilk 5 günde tespit edildi. Bazı hastaların ilk üç gündeki numuneleri negatif idi ancak daha sonraki günlerde pozitifleşti. Bu durum numunelerin inkubasyon safhasında olmasından kaynaklanabilmektedir. Pozitif olan bazı numuneler beşinci günden sonra negatifleşti. Bu durum ise immun yanıtın ortaya çıkmasından kaynaklanabilmektedir. Bu tespitler Uyar ve ark. (2010) yayınında da belirtilmektedir.

Aynı şekilde Burt ve ark.'nın bir çalışmasında PCR pozitif iken PCR negatifleşmesini ise altıncı günden itibaren tespit etmişler, on üçüncü günde hiçbir PCR pozitifliği bulamamışlardır (72).

Hastaların tümünde yattıkları süre boyunca alınan kan numunelerinde ELISA yöntemi ile antijen ve antikor aranması yapılmıştır. 9 hastada (% 22,5) antijen ilk 5 günde pozitif bulundu. Antijen pozitifliği, PCR pozitifliği ile birlikte göstermekteydi. Hatta, çalışmamıza dahil edemediğimiz, elimizde sadece giriş numunesi bulunan ölen üç vakanın antijenleri pozitif bulundu. Bu araştırma benzeri bir yayın bulamadık, sadece keneler üzerinde yapılmış olanlar mevcuttur.

IgM pozitifliği ortalama 5. günde (2.-9. günlerde) ortaya çıktı ve 36 hastada (% 90) tespit edildi. IgM pozitifliğini ekseriyetle ilk 5 günde tespit ettik (24 hastada). PCR tetkiki iki kez negatif çıkan ve Hıfzısıhha Başkanlığı tarafından da aynı biçimde sonuçlanan bir hastada IgM ikinci günde pozitif bulundu ve teşhisi IgM sonucuna göre kondu. Bu sonuç; Burt (1994) Tang ve ark. (2005), Ergönül ve ark. (2006), Duh (2007), Uyar ve ark. (2010)'nın ayrı ayrı yapmış oldukları çalışmalardaki sonuçlarla paralellik göstermekteydi (19, 35, 66, 69, 73).

IgM oluşan hastaların çoğunda, lökosit sayısındaki azalma durmakta, ertesi günlerde artmaya başladığını ancak trombosit sayısında etkisi olmadığı gözlemlendi. Hiçbir benzeri yayında böylesi bir yorum veya tespit bulunamamıştır.

IgG ortalama 8. günde (3.-16. günlerde) ortaya çıkmakta ancak hastaların yarısında tespit edilmiştir. Bunların hepsi ilk 10 günde (dört hasta 10. günden sonra) tespit edilebildi. Aynı tespit Ergönül ve ark., Burt ve ark. ve Tang ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda da mevcuttur (66, 69, 72) ve çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

IgG oluşumu ile birlikte trombosit sayısındaki azalma durmakta, ardından hızla artmaya başladığını gözlemledik (Spearman testi, korelasyon: 0,708). Bu durum ise hastaların genel bulgularının düzelmeye başladığı zamana denk gelmektedir. Hiçbir benzeri yayında böyle bir yorum veya tespit bulunamamıştır.

PCR ve ELISA yöntemleri ile elde edilen bu sonuçlar ışığında değerlendirme yapacak olursak; çoğu yayında RT-PCR standart tanı yöntemi olarak ilk sıraya alınmakta ise de son yıllarda Ergönül ve ark. (2006), Uyar ve ark. (2010)'nın çalışmaları ve bizim bu çalışmamızda gerek süre gerekse vaka sayısı olarak özellikle

IgM yöntemi ile, RT-PCR'a yakın sonuçlar bulunmuştur. KKKAV antijeni ve IgG tespiti ise erken teşhiste aynı derece duyarlı değildir ama pozitiflikleri hastalık seyrinde önem taşımaktadırlar. Gerekli standardizasyonlar ile ELISA, erken tanıda RT-PCR kadar etkili olabilecektir.

Risk faktörleri olarak bir hasta haricinde tüm hastalarda endemik bölgede bulunma, kırsal alanda ikamet, tarım ve hayvancılıkla uğraşma öyküsü varken (% 98), kene teması öyküsü hastaların % 80'inde tespit edilen bir faktördü. Çoğu yayınlarda ise kene teması öyküsü bu hastalık ile özdeşleşmiş görünmektedir (6, 21, 138). Özdemir (2009), 2008 yılında Tokat çevresindeki çalışmasında bu oranı % 94 bulmuştur (74). Ancak Ergönül (2009), yayınında belirttiği kene teması oranı da % 60'tır (14). Bu sebeple kene teması olsun-olmasın sebebi tespit edilemeyen ateşi olan tüm vakalar KKKKA hastalığı şüphesi ile yatırıldı. Hatta bir vakada bir gün önce Tokat'a gelip ertesi gün rahatsızlanma hikayesi mevcuttu. Bir hastada ise kene teması öyküsü olmasına rağmen PCR negatif idi. Bizim çalışmamızdaki % 20 vakada kene teması öyküsünün bulunmaması aslında vakaların hayvancılıkla uğraşırken viremi safhasındaki hayvanın salya ve benzeri çıktıkları ile teması olup da dikkate almamalarından kaynaklanmış olabilir. Bu sebeple kene konusunda insanları uyarırken buna da dikkat etmeleri konusunda uyarılmaları lazımdır.

Hastaların cinsiyeti % 52,5 erkek, % 47,5 kadın olarak tespit edildi. Tüm hastalarda (biri hariç) endemik kırsal alanda yaşam, tarım ve hayvancılık öyküsü mevcuttu. Bizim bulduğumuz cinsiyet oranları ve risk öyküleri Özdemir (2009) ve Ergönül ve ark. (2006) çalışmaları ile uyumlu idi. Ülkemiz genelinde de bu iki grup en sık görülen meslek grubudur (61).

Hastalarda yaş ortalaması 45,4 dir. Ergönül ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada yaş ortalaması 47 bulunmuştur, Özdemir (2009) çalışmasında ise 40,1 idi (35, 74). Çalışma kapsamındaki hasta sayısına göre değişmekle birlikte uyumlu sonuçlardır.

Hastalara ribavirin tedavisi verilmemekle birlikte ölüm vakası görülmedi. Özdemir (2009), Ergönül ve ark. (2006), Uyar ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmalarda ise ribavirin kullanılmasına rağmen ölüm oranı % 5 bulunmuştur (35, 69, 74). Hastaların, KKKKA ve kene konusunda olaya daha hassas yaklaşımları ve sağlık kuruluşlarına çoğunlukla hemorajik döneme girmeden (inkübasyon ve prehemorajik dönem) önce başvurarak erken teşhis ve tedavilerinin yapılması sebep olmuştur. Bu

konuda ayrıca Ergönül ve ark. (2006), oral kullanımın etkili olmadığı, parenteral kullanımın yararlı olacağı görüşündedir (14). Kanaatimizce ribavirin kullanımının gerekliliği konusunda IgM ve IgG takibi faydalı olabilecektir. Çünkü çalışmamızdaki hastaların trombosit sayısı $100.000/\text{mm}^3$ 'e yükseldiğinde bile genel durum değerlendirmesinde taburcu edilmekteydi ve bu hastalarda immunglobulinlerden en az biri muhakkak gelişmişti.

Swanepoel ve arkadaşları (75) hastalığın şiddetli kategoride olup olmadığını gösteren bazı parametreleri tanımlamışlardır. Buna göre hastalık semptomlarının başlamasından sonraki ilk 5 gün içinde;

- 1- Lökosit sayısı $\geq 10.000/\text{mm}^3$,
- 2- Trombosit sayısı $\leq 20.000/\text{mm}^3$,
- 3- AST değeri ≥ 200 U/L,
- 4- ALT değeri ≥ 150 U/L,
- 5- Aktive parsiyel tromboplastin (aPTT) ≥ 60 sn
- 6- Fibrinojen seviyesi $\leq 110 \mu\text{g}/\text{dl}$,

en az birisi varsa hastanın şiddetli kategoride olduğu ve hastalıkta % 90 ölümü gösterebileceği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu kriterlerde vakamız olmadı. Bununla beraber Tokat ilinden 2010 yılında ölüm sayısı 6 olmuştur (% 3) ama bu vakalar trombosit suspansiyonu verilmesi gerektiği düşünülerek dış merkeze sevk edilen ve orada ölen vakalardır. Türkiye'de ise bu oran % 5'tir, dünyada % 15-30'dur (61, 74). Bu oran son on yılda meydana gelen salgınlara nazaran çok düşüktür. 2003 İran salgınında ölüm oranı % 18, 2001 Kosova salgınında % 33, 2004 Moritanya salgınında % 29 olmuştur. Bu duruma moleküler ve serolojik tanı yöntemlerinin erken tanı kullanılıyor olması neden olan en öncelikli faktörlerdendir. Zira İran'da da moleküler ve serolojik erken tanı yöntemlerinin kullanılması ile ölüm oranlarının 2003 yılında % 18 iken 2007'de % 2'lere kadar düştüğü bildirilmiştir (76). İnsanların bu konuda daha ciddi yaklaşımları da diğer bir etkidir.

Trombositopeni ve lökopeni, AST, ALT, LDH, CK enzimlerinin yüksekliği KKKA hastalığı için, birçok çalışmada belirgin bulgular olarak gösterilmiştir (14). Çalışmamızdaki hastalarda da bu bulgular mevcuttu ama en belirginini trombositopeni idi. Bakır (21) ve Yılmaz'ın (61) çalışmalarındaki bulgular ile bizim bulgularımız oldukça uyumlu idi. KKKA virusu, hastalık sırasında lökopeni ve trombositopeniye

neden olmasına rağmen çalışılan hastalarda hemoglobin, hematokrit değerleri ile koagülasyon testlerinde önemli değişikliklere neden olmamıştır (ölüm vakaları hariç). Bu tespit Sağlık Bakanlığı Olası Olgu Tanımı kriterleri ile uyumludur (25, 74). Ergönül ve ark.'nın (2006) çalışmasında özellikle fatal vakalarda PT ve aPTT sonuçları uzamış olarak tespit edildi (14).

Tanı etkinliği açısından yaptığımız değerlendirmede uyguladığımız Revers Transcriptase RT-PCR yöntemi kan numunelerinde hastalık etkeni virus genomik partiküllerini, akut dönemde viremi gelişiminden itibaren tespit edebilmektedir. En iyi zaman ise ilk 5 gündür. İlk üç günde; inkübasyon safhasında olma, viral yükün az olması gibi nedenlerle, 5. günden sonra ise gelişen immun yanıt ve sonucunda vireminin temizlenmesi ile PCR sonucu negatif olabilmektedir. ELISA yönteminde de ilk 5 günde antijen pozitifliğinin (% 22,5) ve IgM pozitifliğinin (% 60) tespit edilebildiğini, RT-PCR yöntemindeki kadar olmasa da gördük. Ancak hastalık seyri boyunca IgM pozitifliğini hastaların % 90'ında mevcuttu ve ilerleyen günlerde bu durum devam etmektedir. Hastalığın tüm safhalarında IgM tespitinin tanıda büyük katkısı olabilmektedir. Ergönül ve ark.'nın (2006) ve Uyar ve ark.'nın (2010) çalışmalarında benzer sonuçlar vardı ve bizim sonuçlarımız ile uyumlu idi (35, 69).

ELISA yöntemi ile 36 hastada IgM pozitifliği (% 90), 9 hastada antijen pozitifliği (% 22,5), 18 hastada IgG pozitifliği (% 44) bulundu (Ancak çalışmaya sadece ilk gün numunesi olması nedeniyle dahil etmediğimiz üç ölüm vakasının da antijen tetkiki pozitif bulundu). ELISA yöntemi ile IgM için Sensitivite: % 94,7 olarak bulundu. Buna göre, ELISA yönteminin gerçek pozitiflikleri saptama oranı yüksektir. İki yöntemin karşılaştırmasında sonuçların birbirine yakın olduğu tespit edildi (Cramer's V testi; Value: 0,221, p= 0,161). KKKA hastalığının erken tanısında RT-PCR yönteminin daha sensitif olduğu ama yalancı negatiflik veya pozitiflik durumunu ekarte etmek için ELISA yöntemini kullanmak gerekir. PCR'ın genomik partiküllerini tespitinde virusun canlı-ölü olduğu ayırımını yapamamasındaki eksiklik, PCR inhibisyonun yaklaşık % 2,1 olması (77) ve IgG oluşumunun trombositlere olan etkisi nedeniyle hastalık seyrinde ve tedavi takibinde katkıları olacaktır. Duh (73) ve Wölfel (49) yaptıkları çalışmalarda düşük viral yük ile IgG yüksekliğinin ters yönde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim tespitimizle paralel bir bulgudur.

Akut dönem içerisinde RT-PCR ve ELISA ile erken tanı koyabilme avantajı

bize erken tedavi imkanı sağlarken mortaliteyi de azaltma imkanı verebilecektir. Erken tanı koyulması, özellikle hastalık bulaşı için büyük risk altında olan hasta yakınları için önem arz etmektedir.

Sonuç olarak; One Step RT-PCR yöntemi yüksek duyarlılığı ve pratik kullanımı sebebiyle Jel Elektroforez yöntemi ile yapılan PCR'a göre ve ELISA yöntemlerine göre daha güvenilir ve üstündür. RT-PCR, KKKA hastalığında standart yöntem olarak özellikle akut dönemin prehemorajik safhasında (İlk 5 günde) KKKA virusunun tespitinde kullanılabilir. Ancak inkübasyon safhasında viral yükün azlığı veya çalışılan cihazların tespit edebildiği asgari viral yüke olan hassasiyeti gibi nedenlerle virus tespiti rölatif olarak yapılamayabilir. Ortalama altıncı günden itibaren PCR ile virus tespiti kısmen azalmaya başlamaktadır. Ayrıca immun reaksiyonun erken devreye girmesi sonucu 3.-8. günlerde PCR negatifleşebilmektedir. ELISA yöntemi ile elde edilen pozitif sonuçlar PCR ile elde ettiğimize yakın düzeyde bulunmuştur. Bununla birlikte klinik bulguları olup da PCR sonucu negatif bulunanlarda ELISA sonucuna göre teşhis konulmaktadır. IgM pozitifliği tespit edilebilmekte ve bu sonuca IgM pozitifliği 2.-9. günlerde (ortalama 5. gün) olmakta ve PCR ile elde ettiğimiz pozitifliğe yakın düzeyde tespit edilmektedir. IgG oluşumu 3.-10. günlerde (ortalama 8. gün) olmaktadır. Bazı vakalarda 10. günden sonra da oluşabilmektedir. IgG oluşunca hastaların trombosit sayısındaki düşüşü durdurarak hızlı bir yükselme eğilimine sokmaktadır ki bu durum hastanın taburcu olma döneminin yakın olduğunu göstermektedir. Çalışmaya dahil olmayan ölen 3 vakanın ilk gün kanlarını tetkik ettiğimizde ise PCR ve antijenin pozitif olduğu, immunglobulinleri ise oluşturamadığı gözlenmiştir. Antijen pozitifliği ise PCR pozitifliği ile birliktelik göstermektedir ama istatistiksel olarak güçlü bir eşleşme yoktur. Çalışmamızda da görüleceği gibi özellikle inkübasyon döneminde klinik laboratuvar bulgularının tam oluşmamış olması ve PCR ile ilgili teknik nedenlerden dolayı RT-PCR bazen tek başına KKKA hastalığının tanısında yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda PCR ile birlikte ELISA yöntemi ile antijen ve IgM aranması, tanıda eksiklikleri giderebilecektir. ELISA yönteminin standardizasyonunda duyarlılığının ve özgüllüğünün geliştirilmesi tanıda PCR'a eşdeğer düzeyde kullanımını mümkün kılacaktır. PCR laboratuvarı olmayan kuruluşlarda ve periferdeki sağlık merkezlerinde kene ısırığı veya KKKA hastalığı bulguları olanların erken tanısında kullanılarak vakalar yönlendirilebilir. Yatan hastalarda IgG tespiti,

hastanın durumu ve bulaştırıcılığı hakkında yönlendirici olabilmektedir.

Böylece KKA hastalığının tanısı daha hızlı yapılarak hastalığın yayılımı ve bulaşıcılığı, hastaların morbidite ve mortalitesinde azalmalar sağlanabilecektir.

SONUÇLAR

1. One Step Real Time PCR yönteminin etkinliği, KKKA tanısında etkinliği Jel Elektroforez yöntemi kullanılan PCR ve ELISA yöntemlerine göre daha yüksektir.
2. Hastalıkta; endemik kırsal kesimde yaşama, tarım ve hayvancılık en önemli risk faktörleri olarak görülmektedir.
3. Kene teması öyküsü hastalarda risk faktörü olarak üçüncü sırada bulunmuştur. Ancak hastalar viremik hayvanların salya ve benzeri çıktılarını ile olan temaslarından farkında olmadığından kene temasını tam tespit edemeyebilmektedirler.
4. KKKA vakalarında yaş ortalaması 45,4 dır.
5. Hastalık cinsiyet ayrımı yapılmamaktadır ($p>0,05$).
6. Hastalarda genel bulgular olarak; ateş, trombositopeni, lökopeni, ALT, AST, LDH, CK enzimleri yüksekliği tespit edildi.
7. KKKA hastalığı düşünülen vakalarda benzer bulgular başka hastalıklarda da görülebildiğinden ayırıcı tanıya yönelik (özellikle Brucella, Hepatit için) testler de yapılmalıdır.
8. Vakaların kene teması sonrası inkubasyon safhasında alınan ilk hematolojik ve biyokimyasal tetkiklerde ve muayenede patolojik bir durum tespit edilemeyebilmekte ve erken teşhis konulamamaktadır. İleriki günlerde bulguların ortaya çıkması sebebiyle tanı konabilmektedir. Ancak bu vakalara ilk günden itibaren PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak erken teşhis konulabilmektedir.
9. Hastalığın erken ve hızlı tanısında, akut dönemde One Step Real Time RT-PCR yöntemi başvurulması gereken güvenilir bir yöntemdir. 4 saat gibi kısa sürede sonuçlanmakta olması, spesifik problemlerin multipleks olarak kullanılması, kapalı sistem olduğundan kontaminasyon riskini en aza indirerek daha hassas ve kesin sonuçlar verebilmesi klasik PCR yöntemlerine nazaran belirgin avantajlarıdır.
10. RT-PCR'ı standart yöntem olarak kabul ederek ELISA yönteminde IgM için Sensitivite: % 94,7 olarak bulundu. Buna göre, ELISA yönteminin gerçek pozitiflikleri saptama oranı yüksek bulunmuştur. Ayrıca iki yöntemin karşılaştırmasında sonuçların birbirine yakın olduğu tespit edildi (Cramer's V testi; Value: 0,221, $p= 0,161$).
11. Real Time RT-PCR yönteminin ilk 5 günde yapılması daha uygun bir

zamanlamadır. Erken gelişen immun yanıt ve buna bağlı azalan viral yüke bağlı olarak İlk 5 günde pozitif iken daha sonra yapılan Real Time RT-PCR tetkiklerinde, negatiflik saptanabilmektedir.

12. İnkubasyon safhası göz önünde bulundurularak ilk gün numunesinde PCR sonucu negatif bulunanlarda RT-PCR yönteminin 3 gün sonra tekrarı yapılması gerekmektedir.
13. Klinik ve laboratuvar bulguları mevcut olsa da RT-PCR bazen pozitif sonuç veremeyebilmektedir (% 2). Bu durumda ELISA yöntemi ile antijen ve IgM tetkikleri mutlaka kullanılmalıdır. ELISA yöntemi ile çıkan pozitiflikler erken teşhiste klinisyene yardımcı olacaktır.
14. KKKA virusu, hastalık sırasında lökopeni ve trombositopeniye neden olmasına rağmen hastaların hemoglobin, hematokrit değerleri ile koagülasyon testlerinde önemli değişikliklere neden olmamıştır (ölüm vakalarında koagülasyon testlerinde bozulma mevcuttur).
15. Endemik kırsal alanda yaşam, tarım ve hayvancılık en sık bulunan risk faktörleridir, kene teması ise vakaların % 80'inde tespit ettiğimiz bir faktördür. PCR negatif olan hastalarda bile kene teması öyküsü birçoğunda bulunmaktadır. Bu nedenle endemik bir bölgede sebebi tespit edilemeyen ateş etiyojisi ile birlikte enfeksiyon bulguları ile başvuran vakalarda kene teması olsun-olmasın KKKA hastalığı olabileceği unutulmamalıdır.
16. Antijenin pozitif bulunduğu durumlarda RT-PCR da pozitif bulunmaktadır. Bu durum özellikle ilk 5 günde gözlenmektedir. Ölen vakaların ise hepsinde ilk gün kan numunelerinde pozitiflik mevcut idi. Ancak istatistiksel olarak yeterli korelasyon mevcut değildir.
17. IgM ortalama 5. günde (2.-9. günlerde) ortaya çıkmakta ve RT-PCR'a yakın düzeyde sayıda tespit edilmektedir. Hastaların çoğunluğunda IgM oluşması ile birlikte lökosit sayısındaki azalma durmakta, ertesi günlerde artmaya başlamakta olduğu gözlenmektedir.
18. IgG ortalama 8. günde (3.-16. günlerde) ortaya çıkmakta ve çoğunlukla ilk 10 günde tespit edilmektedir. IgG oluşumu ile birlikte trombosit sayısındaki azalma durmakta, ardından hızla artmaya başlamaktadır. Bu ilişkinin anlamlılığı Spearman testi ile tespit edildi (Korelasyon: 0,708).

19. Antijen ve IgM her ikisi de aynı günlerde tespit edilebilmekte ama antijen pozitifliği IgM pozitifliğine oranla daha az oranda bulunmaktadır. Bu sebeple KKKA hastalığının erken tanısında ELISA yöntemlerinden IgM aranması daha faydalı olacaktır.
20. ELISA yönteminin 2-2,5 saatte sonuçlanabilmesi, manuel veya otomatik cihazla yapılabilmesi, spesifik teknik ekipman gerektirmemesi, uygulanabilirliği kolay olması nedeniyle PCR laboratuvarı bulunmayan veya gerekli donanıma sahip olmayan sağlık birimlerinde ve kırsal alan saha taramalarında ELISA yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem ile kene temasına maruz kalmış veya sebebi belli olmayan ateş ve enfeksiyon bulgularına sahip vakalarda antijen ve IgM araştırılarak hastaların yönlendirilmesi ve erken teşhisine katkısı olacaktır.
21. PCR yöntemlerinin maliyeti dikkate alındığında endemik bölgedeki vakalara ELISA yöntemi uygulanması fazla masraflı olmayan pratik bir yöntem olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Midilli K, Gargili A, Ergonul O, Sengoz G, Ozturk R, Bakar m, Jongejan F. Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in İstanbul. 2007 Jun 6;7;54. İstanbul University, Cerrahpaşa Medical Faculty, Microbiology and Clinical Microbiology Department, İstanbul
2. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 2006 Apr;6(4):203-14.
3. Ergonul O, Whitehouse C. Introduction. Ergonul O, Whitehouse C, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective.* Dordrecht: Springer, 2007: 3-11, 323-328.
4. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol.* 1979 May 22;15(4):307-417.
5. Ergonul O, Akgunduz S, Kocaman I, Vatansever Z, Korten V. Changes in temperature and the Crimean Congo Hemorrhagic Fever outbreak in Turkey. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 2-5, 2005, Copenhagen. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (S2): 360.
6. Whitehouse CA. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Antiviral Res.* 2004 Dec;64(3):145-60.
7. http://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/en son erişim: 21/05/2010
8. Elaldı N, Bakır M. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. *ANKEM Dergisi* 2006;20 (Ek 2):227-231
9. Mardani M, Rahnavardi M, Rajaeinejad M, Naini KH, Chinikar S, Pourmalek F, Rostami M, Shahri MH. Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers in Iran: a seroprevalence study in two endemic regions. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Mar;76(3):443-5.
10. Wilke Topçu A. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul 2008 s: 1251-1265
11. Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Doganci L, Tulek N, Guler N, Duru F. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome. *Am J Hematol.* 2008 Jan;83(1):73-6.
12. Çom S. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi: Ülkemizdeki Durum. II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Kasım 2008. Ankara. 45-47
13. Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, Besirbelliöglu BA, Bodur H, Basustaoglu AC, Guney C, Avcı İY, Sener K, Sette MH, Kubar A. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Dec;58(6):358-62.
14. Ergönül Ö, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Dergisi* 2009,23(Ek 2),234,240
15. Bodur H. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi ve DAS yönetimi. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. Antalya 2007. S.509-520
16. Watts D.M., Ksiassek T.G., Linthicum K.J. and Hoogstraal H. Crimean-Congo Hemorrhagic fever. In T.P. Monath, ed. *The arbovirusas: epidemiology and ecology*, vol.2. CRC, Boca Raton, FL,USA, 1988 177-260

17. <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Agentlist.asp> son erişim: 22/04/2010
18. Marriott AC, Polyzoni T, Antoniadis A, Nuttall PA. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J Gen Virol.* 1994 Sep;75 (Pt 9):2157-61.
19. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect.* 1994 Dec;113(3):551-62.
20. Yen YC, Kong LX, Lee L, Zhang YQ, Li F, Cai BJ, Gao SY. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 1179-82 Simpson
21. Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol* 2005; 54: 385-9.
22. Antoniadis A, Casals J. Serological evidence of human infection with Congo-Crimean hemorrhagic fever virus in Greece. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31:1066-7.
23. Ospanov B, Hewson R, Hay J. Crimean-Congo haemorrhagic fever and haemorrhagic fever with renal syndrome in Kazakhstan. 17th ECCMID/25 ICC Posters March 2007, Page S429
24. http://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/en son erişim: 21/05/2010
25. Özkaya E, Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Epidemiyolojisi. 2. Türkiye zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, 2008. 68-69.
26. Sağlık bakanlığından edinilen bilgi, 14/09/2010.
27. Özdamarlı A, Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Epidemiyolojisi. 2. Türkiye zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, 2008. 55-56.
28. M. Izadi, H. Salehi, K. Mostafavi, S. Chinikar, B. Ataei, F. Khorvash, M. Darvish, N. Jonaidi jafari. P1042 Sero epidemiology of Crimean-Congo haemorrhagic fever in domestic animals in central area of Iran. 17th ECCMID / 25th ICC March 2007, Pages S279-S280.
29. Williams RJ, Al-Busaidy S, Mehta FR, Maupin GO, Wagoner KD, Al-Awaidy S, Suleiman AJ, Khan AS, Peters CJ, Ksiazek TG. Crimean-congo haemorrhagic fever: a seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman. *Trop Med Int Health.* 2000 Feb;5(2):99-106
30. Hassanein KM, el-Azazy OM, Yousef HM. Detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus antibodies in humans and imported livestock in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Sep-Oct;91(5):536-7.
31. Akyazı R, Ecevit O, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006,21(3): 340-349 J. of Fac. of Agric. OMU, 2006,21(3): 340-349
32. Barker SC, Murrell A, 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129 Suppl: S15-36
33. Vatansever Z. Vektör Kenelerin Ekolojisi. II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Kasım 2008. Ankara. 27-36.
34. Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdamarlı A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):4120-4.
35. Uyar Y, 2008 Yılı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Olgularının Laboratuvar Tanısında PCR ve ELISA-IgM Sonuçlarının İrdelenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010; 44: 57-64.
36. Özkaya E, Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Epidemiyolojisi. 2. Türkiye zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, Ankara, 2008. 67.

37. Flick R, Molecular Biology Of The Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Ergonul O, Whitehouse C, eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht: Springer, 2007: 35-44.
38. Andersson I, Simon M, Lundkvist A, Nilsson M, Holmström A, Elgh F, Mirazimi A. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *J Med Virol*. 2004 Jan;72(1):83-93.
39. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*. 2002 Jul;76(14):7263-75
40. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST. Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein. *J Virol*. 2006 Jan;80(1):514-25.
41. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldmann H, Flick R. Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virol J*. 2005 Apr 25;2:42.
42. Kinsella E, Martin SG, Grolla A, Czub M, Feldmann H, Flick R. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology*. 2004 Mar 30;321(1):23-8.
43. Nabeth P, Thior M, Faye O, Simon F. Human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1881-2.
44. Schmaljohn, C.S, Hooper, J.W., 2001. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, fourth ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1581–1602.
45. Flick R, Flick K, Feldmann H, Elgh F. Reverse genetics for crimean-congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*. 2003 May;77(10):5997-6006.
46. Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson KE, Lundkvist A, Haller O, et al. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol* 2004;78(8):4323–9.
47. Andersson I, Lundkvist A, Haller O, et al. Type I interferon inhibits Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J Med Virol* 2006;78(2):216-22.
48. Hewson R, Molecular Epidemiology, Genomics, And Phylogeny Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Ergonul O, Whitehouse C, eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht: Springer, 2007: 45-55
49. Wölfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, Georges-Courbot MC, Papa A, Günther S, Drosten C. Virus Detection and Monitoring of Viral Load in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Patients. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul;13(7):1097-100.
50. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;30(5-6):375-89. Epub 2007 Aug 10.
51. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med*. 2005 Dec;5(8):753-60.
52. Gözalan A, Akin L, Rolain JM, Tapar FS, Oncül O, Yoshikura H, Zeller H, Raoult D, Esen B. Epidemiological evaluation of a possible outbreak in and nearby Tokat province. *Mikrobiyol Bul*. 2004 Jan-Apr;38(1-2):33-44

53. Hewson R, Gmyl A, Gmyl L, Smirnova SE, Karganova G, Jamil B, Hasan R, Chamberlain J, Clegg C. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*. 2004 Oct;85(Pt 10):3059-70.
54. Lukashev AN. Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*. 2005 Aug;86(Pt 8):2333-8.
55. Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, Coffield LM, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Zaki SR. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Arch. Pathol Lab Med*. 1997 Aug;121(8):839-46.
56. Geisbert TW, Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12 Suppl):S110-21.
57. Yashina L, Petrova I, Seregin S, Vyshemirskii O, Lvov D, Aristova V, Kuhn J, Morzunov S, Gutorov V, Kuzina I, Tyunnikov G, Netesov S, Petrov V. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. *J Gen Virol*. 2003; 84(Pt 5): 1199 - 1206.
58. Kaya Ş, Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalarında Ardışık Serum Sitokin Seviyeleri, Virus Titreleleri ve Oral Ribavirin Tedavisinin Etkisi. Uzmanlık tezi. 2008; S.10-11,Sivas.
59. Cagatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, Basaran S, Yenerel M, Yavuz S, Midilli K, Ozsut H, Eraksoy H, Calangu S. Haemophagocytosis in a patient with Crimean Congo haemorrhagic fever. *J Med Microbiol*. 2007 Aug;56(Pt 8):1126-8.
60. Kaya Ş, Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalarında Ardışık Serum Sitokin Seviyeleri, Virus Titreleleri ve Oral Ribavirin Tedavisinin Etkisi. Uzmanlık tezi. 2008;S.74, Sivas.
61. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, Torunoglu MA. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002—2007. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov 3.
62. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, Billecocq A, Hooshmand B, Crance JM, Garin D, Bouloy M. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol*. 2006 Feb;35(2):154-9. Epub 2005 Aug 8.
63. <http://www.genetiklab.com>. Son erişim 22/06/2010.
64. Wolk D, Mitchell S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. *Infect Dis Clin North Am*. 2001 Dec;15(4):1157-204.
65. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol*. 2005 Sep;77(1):83-8.
66. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of rimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol*. 2005 Feb;75(2):295-9.
67. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis*. 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S801-6.
68. Tarantola A, Nabeth P, Tattevin P, Michelet C, Zeller H; Incident Management Group. Lookback exercise with imported Crimean-Congo hemorrhagic fever,

- Senegal and France. *Emerg Infect Dis.* 2006 Sep;12(9):1424-6.
69. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N, Eren S, Dokuzoguz B. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: severity criteria revisited. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Jun;12(6):551-4.
 70. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008 Apr;78(1):125-31. Epub 2007 Dec 3.
 71. Zeller H. Laboratory Diagnosis Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Ergonul O, Whitehouse C, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective.* Dordrecht: Springer, 2007: 233-243.
 72. 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.* 1998 Feb;70(2):129-37.
 73. Duh D, Saksida A, Petrovec M, Ahmeti S, Dedushaj I, Panning M, Drosten C, Avsic-Zupanc T. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerg Infect Dis.* 2007 Nov;13(11):1769-72.
 74. Özdemir M, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Revers Transkriptaz PCR İle Tanısı, uzmanlık tezi. 2009. Tokat.
 75. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis.* 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S794-800.
 76. Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, Ghiasi SM, Mirahmadi R, Haeri A, Moradi M, Afzali N, Rahpeyma M, Zeinali M, Meshkat M. Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran. *Transbound Emerg Dis.* 2008 Aug;55(5-6):200-4.
 77. Drosten C, Seifried E, Roth WK. TaqMan 5'-nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-packaged competitive internal control for high-throughput blood donor screening. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4302-8.